

Lívia de Carvalho Fontes

**Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração:  
Microbiologia

Orientado: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo  
2015

## RESUMO

FONTES, L. C. **Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados.** 2015. 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A pesquisa em biorremediação está em crescente desenvolvimento. Muitos processos estão sendo desenvolvidos a fim de recuperar áreas contaminadas por metais pesados, entretanto microrganismos possuem maneiras mais ecologicamente indicadas para remoção, imobilização ou transformação de poluente. A existência de uma área contaminada por metais pesados pode gerar problemas sérios, como danos a saúde e comprometimento da qualidade dos recursos hídricos. No Brasil, a poluição do ambiente aquático tem resultado em grande poluição dos rios, lagos, represas, e dentre os elementos poluentes temos os metais pesados, que são elementos extremamente recalcitrantes. Segundo relatórios preparados pela CETESB, a ocorrência deste tipo de contaminação apresenta uma frequência alta no ambiente aquático. Assim, estudos que caracterizam fungos com capacidade de degradação destes poluentes, se fazem necessários. Assim sendo, o objetivo geral desse trabalho foi isolar e caracterizar espécies fúngicas em ambientes aquáticos contaminados por metais pesados e realizar a inserção de genes exógenos ao DNA de fungo, a fim de obter maior capacidade de absorção de metais pesados em sua superfície celular. Um total de 340 isolados fúngicos resistentes a quatro diferentes metais pesados (Chumbo, Cádmio, Cromo e Mercúrio) foram selecionados através de prévio *screening*. A identificação dos isolados foi dada através de metodologia clássica como exame direto e microcultivo, além de seqüenciamento do gene ITS. Entre os fungos filamentosos isolados (n=262), o gênero *Penicillium* foi o mais numeroso (n=51) seguido de *Trichoderma* (n=27), *Aspergillus* (n=20), *Fusarium* (n=14) e *Cladosporium* (n=8). Alguns fungos filamentosos (n=108) não foram possíveis serem identificados por metodologias clássicas como exame direto e microcultivo sendo denominados FNE (fungo não esporulado). Dentre os isolados, 78 isolados foram identificados como leveduras. Dentre os fungos leveduriformes identificados mais frequentemente, encontra-se o gênero *Rhodotorula* (n=12), seguidos de *Candida* (n=3), e *Cryptococcus* (n=3). Os isolados foram testados quanto a sua velocidade de crescimento radial (VCR) em meios suplementados com altas concentrações de metais pesados. As cepas que obtiveram maior velocidade de crescimento radial frente a cada um dos metais pesados foram uma cepa de *Trichoderma* sp. apresentando um VCR de 0,9cm/dia (Pb), VCR de 0,7cm/dia (Cd), VCR de 0,8cm/dia e VCR de 0,9cm/dia (Hg). *Curvularia afinis* apresentou uma VCR de 0,3cm/dia; Uma cepa do gênero *Penicillium* apresentou alta VCR na maior concentração testada que foi de 0,26cm/dia na concentração de 0,5g/L de Cádmio; Um fungo do gênero *Aspergillus* apresentou VCR de 0,42cm/dia e o fungo *Microsphaeropsis arundinis* apresentou VCR de 0,24 cm/dia. A cepa que apresentou melhor capacidade de retenção de metal pesado (*Trichoderma*

harzianum foi observada em microscópio eletrônico de transmissão e observado a capacidade desta de reter metais pesados tanto na superfície celular como no seu interior. Uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada com o gene sintético EC20 que codifica uma fitoquelatina sintética para aumento da capacidade de retenção de metais pesados mostrando por Microscopia Eletrônica de Transmissão a capacidade aumentada da cepa transformada.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Metais pesados. Fungos. Melhoramento Genético. Fitoquelatina

## ABSTRACT

FONTES, L. C. **Isolation and selection of fungi with potential for bioremediation of contaminated environmental by heavy metals.** 2015. 91p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The research on bioremediation is in constant development. Many processes are being developed in order to recover areas contaminated by heavy metals, microorganisms have however indicated more environmentally ways for removal, immobilization or transformation of pollutant. The existence of an area contaminated by heavy metals can cause serious problems, such as health damage and impaired quality of water resources. In Brazil, the pollution of the aquatic environment has resulted in serious pollution of rivers, lakes, dams, and from the polluting elements have heavy metals, which are extremely recalcitrant elements. According to reports prepared by CETESB, the occurrence of this type of contamination has a high frequency in the aquatic environment. Thus, studies that characterize fungi with degradation capacity of these pollutants, are needed. Thus, the aim of this study was to isolate and characterize fungal species in aquatic environments contaminated by heavy metals and make insertion of exogenous genes to fungal DNA, to obtain a greater capacity of absorbing heavy metals into their cell surface. A total of 340 fungal isolates resistant to four different heavy metals (Lead, Cadmium, Chromium and Mercury) were selected through prior screening. The identification of the isolates was given by classical methods such as direct examination and microcultivation, and sequencing of ITS gene. Among the filamentous fungal isolates (n = 262), *Penicillium* was the most numerous (n = 51) followed by *Trichoderma* (n = 27), *Aspergillus* (n = 20), *Fusarium* (n = 14), *Cladosporium* (n = 8). Some filamentous fungi (n = 108) were not possible be identified by classical methods such as direct examination and microcultivation being called FNE (not sporulated fungus). Among the isolates, 78 isolates were identified as yeasts. Among the most commonly identified fungal yeast, is the genus *Rhodotorula* (n = 12), followed by *Candida* (n = 3), and *Cryptococcus* (n = 3). The isolates were tested for their radial growth rate (VCR) in medium supplemented with high concentrations of heavy metals. Strains that obtiverammaior radial growth rate against each of the heavy metals were a strain of *Trichoderma* sp. having a VCR 0,9cm / day (Pb), VCR 0.7cm / day (Cd), VCR 0.8cm / day and VCR 0,9cm / day (Hg). *Curvularia afinis* presented a VCR 0.3 cm / day; A strain of *Penicillium* showed high VCR in the highest concentration which was 0,26cm / day at a concentration of 0.5 g / L of cadmium; A fungus of the genus *Aspergillus* presented VCR 0,42cm / day and the fungus had VCR *arundinis* *Microsphaeropsis* 0.24 cm / day. The strain showed the best heavy metal retention capacity (*Trichoderma harzianum* was observed in a transmission electron microscope and observing the ability of this to retain heavy metals in both the cell surface and in its interior. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* was transformed with the synthetic gene EC20 encoding a synthetic phytochelatin to increase heavy metals retention.

**Keywords:**Bioremediation. Heavy metals. Fungi. Genetical Enhancement. Phytochelatin

## 1 INTRODUÇÃO

A preservação e recuperação do meio ambiente é hoje uma grande preocupação. O desenvolvimento industrial, que é o maior causador dos problemas relacionados à poluição e contaminação ambiental, ocorreu de forma muito acelerada a partir da revolução industrial. A partir daí, a emissão de tais fontes contaminantes no ambiente provenientes de atividades industriais aumentou de forma descontrolada. Em se tratando do Estado de São Paulo, a falta de planejamento prévio estratégico seguido pelo crescimento acelerado, resultando na instalação de indústrias em áreas que passaram a ser altamente urbanizada. Ao mesmo tempo, uma política de gerenciamento ambiental, principalmente, nas décadas de 60 a 90 era muito falha, originando áreas super contaminadas por diversas substâncias tóxicas, geralmente, colocando em risco a saúde da comunidade próxima a estes locais (COLLA, 2008).

No Brasil, os rios que cortam as grandes cidades são muitas vezes afetados por atividades antropogênicas. Em São Paulo, o rio Tietê é um exemplo disto. Além disso, represas (como a Billings) localizadas na região metropolitana vêm apresentando ao longo dos anos problemas graves de poluição. O rio Tietê conta com aproximadamente 1.100 km de extensão, sendo considerado o rio mais importante de todo Estado de São Paulo devido ao seu grande potencial hidroelétrico que é bem explorado em quase toda a sua extensão. Com o aumento da população e das indústrias na cidade de São Paulo, o rio Tietê se tornou um dos rios mais poluídos do mundo, sendo frequentemente alvo de esgotos tanto domésticos quanto industriais, deteriorando cada vez mais a qualidade de suas águas e sedimentos (MORTATTI et al., 2002). Os metais pesados estão presentes entre os principais poluentes originários dessas atividades causadas pelo homem (SILVA, 2009).

Em países onde a água não é um recurso tão abundante como no Brasil, muitas vezes o efluente de esgoto pode contribuir com parcela substancial do fluxo dos rios. Assim sendo, a remoção destes compostos altamente tóxicos tais como os metais pesados presentes nas nas estações de tratamento de esgotos em águas residuárias é de suma importância uma vez que impede que as concentrações de tais compostos tóxicos presentes no efluente extrapolem as concentrações permitidas pelos padrões de emissão causando impactos negativos nos corpos receptores (MORTATTI et al., 2002).

As grandes quantidades de espumas de rios poluídos também contribuem significativamente com a poluição, uma vez que estas são ricas em material particulado e metais pesados como cobre, chumbo, níquel e cádmio, por exemplo (BARKAY, 2003). Estas concentrações de metais pesados nas espumas do rio Tietê superam os valores em 20 a 188 vezes aos observados na água (FRANKLIN, 2010). Esses metais pesados podem ser provenientes de efluentes industriais não tratados previamente antes de serem descartados nas águas do rio e apesar de seus efeitos serem menos visíveis, seus impactos são muito mais difíceis de serem remediados, pois é pouco conhecida a resposta dos ecossistemas naturais à exposição crônica a esse grupo de contaminantes que não são degradáveis, acumulando-se progressivamente nos ecossistemas naturais e afetando seu funcionamento durante décadas ou até mesmo séculos (FRANKLIN, 2010).

No caso da represa Billings (reservatório do Rio Grande), que durante muitos anos recebeu água proveniente de um desvio do rio Tietê, tem um histórico de contaminação por mercúrio, inviabilizando completamente o uso de suas águas para atividades como consumo, irrigação, cultivo e recreação (FRANKLIN, 2010).

Os metais pesados são elementos altamente reativos e bioacumuláveis nos organismos vivos ao longo de toda cadeia trófica. Assim sendo, dentre os vários poluentes existentes, os metais pesados têm recebido atenção especial, uma vez que alguns deles são extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos, mesmo em concentrações muito baixas (GAAD, 2009; VALDMAN; LEITE, 2000). Por isso tem sido grande o interesse nos metais pesados com relação à sua composição química, efeitos biológicos, destino no ambiente e seu controle. Os metais pesados presente nas águas residuárias são originados a partir de atividades industriais, comerciais e domésticas, o que faz com que seja inevitável a sua presença no ambiente aquático (ZABEL, 1993). Contudo, a prevenção da poluição, a limpeza e/ou remediação de áreas contaminadas tornou-se, nos últimos anos, uma das prioridades ambiental.

As indústrias estão sendo impelidas a introduzirem novas técnicas ou tecnologias de purificação e reciclagem, com propósito de reduzir consideravelmente a contaminação no ecossistema. Dentre as inúmeras tecnologias para remediação de águas e solos contaminados, destaca-se a biorremediação como opção para promover a detoxificação do local ou a remoção dos elementos contaminados.

## 7 CONCLUSÕES

- Todos os fungos isolados e testados foram resistentes a pelo menos um metal pesado testado;
- Fungos do gênero *Penicillium* foram os mais frequentemente isolados;
- Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam alta resistência a todos os metais pesados testados
- Comprovada a construção do gene da fitoquelatina sintética
- Sequenciamento do gene ITS possibilitou a identificação de uma grande diversidade de fungos isolados no ambiente aquático;
- Fungos do gênero *Trichoderma* apresentaram maior VCR frente aos íons Chumbo, Cádmio, Cromo e Mercúrio;
- Fungo *Curvularia afinis* apresentou elevado VCR frente ao íon Chumbo;
- Fungo do gênero *Penicillium* apresentou elevado VCR frente ao íon Cádmio;
- Fungo do gênero *Aspergillus* apresentou elevado VCR frente ao íon Cromo
- A espécie *Microsphaeropsis arundinis* apresentou elevado VCR frente ao íon Mercúrio;
- Todos os isolados do gênero *Trichoderma* demonstraram maior velocidade de crescimento radial frente a todos os metais pesados testados, no entanto isso não definiu que fungos deste gênero sejam os mais eficientes na adsorção destes metais.
- Os vetores contendo o gene EC20 foram transformados com sucesso em cepa de *Saccharomyces cerevisiae*;
- A cepa de *Trichoderma harzianum* demonstrou a capacidade de retenção de metais pesados tanto na parede celular quanto em seu interior.
- O sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens* se mostrou como ferramenta eficiente para a transformação fúngica.
- O fungo *S. cerevisiae* expressando EC20sp na membrana externa mostrou ter superior capacidade de ligar  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  e  $Cr^{+2}$  em relação à levedura não recombinante
- Comprovada a localização do metal pesado na célula fúngica
- O fungo EC20sp não apresentou alterações quanto à capacidade de crescimento
- Avaliação da distribuição dos metais pesados na célula fúngica por Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão antes e depois da transformação genética fúngica;
- Melhoramento de linhagens fúngicas capazes de reter metais pesados na superfície celular.
- Fungo expressando EC20sp pode ser empregada em processos de biorremediação de efluentes contendo metais pesados.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T. V.; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Res. J. Chem. Environ.**, v. 7, p. 71-78, 2003.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.
- ARX, J. A. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2<sup>nd</sup> ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 315p.
- BAE, S. R.; ABRAHIM, T. E. Studies on chromium (VI) Adsorption– desorption using immobilized fungal biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 87, p. 17-26, 2003.
- BAE, W.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 88, p. 223-227, 2002.
- BAE, W.; WU, C. W.; KOSTAL, J.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3176-3180, 2003.
- BAE, W.; MEHRA, R. K.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5335-5338, 2001.
- BARKAY, T. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, v.27, p.355-384, 2003.
- BARRON, G. L. **The genera of hyphomycetes from soil**. New York: Robert E. Krieger Publishing, 1972. 364 p.
- BIONDO, R.; SILVA, F. A.; VICENTE, E. J.; SARKIS, J. E. S.; SCHENBERG, A. C. G. Synthetic Phytochelatin Surface Display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for Enhanced Metals Bioremediation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 8325-8332, 2012.
- BISHNOI, N. R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K. Biosorption of Cr(VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca-alginate beads. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 45, p. 657-664, 2007.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BISHOP, P. L. **Pollution prevention: fundamentals and practice.** Beijing: Tsinghua University Press, 2002.

BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** 2002. Tese (Mestrado) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 149-154, 1994.

BULJAN, J. Pollution limits for discharge of tannery effluents into water bodies and sewers. **World Leath.**, v. 9, p. 65-68, 1996.

CAIRNEY, T. **Contaminated land.** London: Blackie, 1993.

CHEN, C. Removal of heavy metal ions by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Environ. Eng.**, v. 136, n. 1, p. 95-102, 2010.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, L.; LIMA, M.; BERTOLIN, E.; COSTA, L. A. V. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciênc. Agrotec.**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

COMBER, S.; GARDNER, M. **J. Environ. Monitor.**, v. 5, p. 410-413, 2003.

DHANKHAR, P. C.; HOODA, R.; H. P. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of a chromium (VI) compound in comparison to a basic chromium (III) tanning agent. **World Leath.**, v. 11, p. 66-70, 2011.

DOREA, J. G. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v.13, p.239-48, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - Nanotechnology White Paper. Disponível em: <[http://www.epa.gov/OSA/pdfs/EPA\\_nanotechnology\\_white\\_paper\\_external\\_review\\_draft\\_12-02-2005.pdf](http://www.epa.gov/OSA/pdfs/EPA_nanotechnology_white_paper_external_review_draft_12-02-2005.pdf)>. Acesso em: 09 ago. 2015

FRANKLIN, R. L. **Determinação de mercúrio total e orgânico e avaliação dos processos de metilação e desmetilação em sedimentos do reservatório Rio Grande, estado de São Paulo.** Tese. (Doutorado) – Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FRITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. Agrobacterium and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, v. 107, p. 803-810, 2003.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2009.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for biorremediation. **Geoderma**, v. 122, p. 109-119, 2004.

GIETZ, R. D.; SUGINO, A. Methods to enhance *S. cerevisiae*. **Gene**. v. 74, p.527-534, 1988.

HAFEZ, N.; ABDEL-RAZEK, A.S.; HAFEZ, M. B. Accumulation of some heavy metals on *Aspergillus flavus*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 68, p. 19-22, 1997.

HÖLKER, U.; FAKOUSSA, R.; HÖFER, M. Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize low-rank coal. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 351-355, 1995.

HU, H.; JIN, Q.; KAVA, P.A Study of Heavy Metal Pollution in China: Current Status, Pollution-Control Policies and Countermeasures. **Sustainability**, v. 6, p. 5820-5838,2014.

JOSHI, P. K.; SWARUP, A.;MAHESHWAR, S.; KUMAR, R.; SINGH, N. Bioremediation of Heavy Metals in Liquid Media Through Fungi Isolated from Contaminated Sources. **Indian J. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 482-487, 2011.

JUBERG, D.R.; KLEIMAN, C.F. & KWON, S.C. Position paper of the American council on science and health: lead and humam health. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 38, p. 162-180, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillusniger*. **Biores. Technol.**, v. 61, p. 221-227, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungi biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KAPOOR, A. Fungi as biosorption. In: Wase DAJ, Forster CF, editors. Biosorbents for Metal Ions. London, UK: Taylor & Francis, p. 67-85, 1997.

KOTRBA, P.; DOLEKOVA, L.; LORENZO, V. D.; RUMML, T.Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides.**Appl Environ Microbiol.**, v. 65, p. 1092-1098, 1999.

KRAUTER, P.; MARTINELLI, R.; WILLIAMS, K.; MARTINS, S. Removal of Cr(VI)from Ground Water by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biodegradation**, v. 7, p. 277-286, 1996.

LEBRUN, M.; AUDURIER, A.; COSSART, P. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeriamonocytogenes*are similar to cadA and cadC of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. **J Bacteriol.**, v. 176, p. 3040-3048, 1994.

- MACEDO, L. S.; MORRIL, W. B. B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: revisão de literatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, p. 29-38, 2008.
- MARTIN, S.; GRISWOLD, W. Human health effects of heavy metals. **Environ. Sci. Technol. Br.**, v. 15, p. 1-6, 2009.
- MEJÁRE, M.; BÜLOW L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 67-73, 2001.
- MELGAR, M.J.; ALONSO, J.; GARCIA, M. A. Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Agaricus macrospores*. **Science of the Total Environment**, v. 385, p. 12-19, 2007.
- MONACHESE, M.; BURTON, J. P.; REID, G. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics? **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 397-640, 2012.
- MONEY, C. A. Options for cleaner chromium tanning. *In* Clean Technology Challenges, Part 2, XXV IULTCS, India, p. 27-30, 1999.
- MORLEY, G. F.; GADD, G. M. Sorption of toxic metals by fungi and clay materials. **Mycol. Res.**, v. 99, p. 1428-1439, 1998.
- MORTATTI, J.; BERNARDES, M. C.; PROBST, J. L.; LELEYTER-REINERT, L. Composição química dos sedimentos fluviais em suspensão na bacia do rio Piracicaba: extração seletiva de elementos traço. **Geochimica Brasiliensis**, v. 16, n. 2, p. 123-141, 2002.
- NRIAGU, J. O. Mercury pollution in Brazil. **Nature**, v. 356, p. 389-396, 1992.
- NRIAGU, J. O.; NIEBOER, E. Chromium in the natural and human environments. **Mycol. Res.**, 1988.
- ORLOVICH, D. A.; ASHFORD, A. E. Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Protoplasma**, v. 173, n. 91-102, 1993.
- PAOLETTI, M. G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 74, p. 1-18, 1999.
- PEINTNER, U.; MOSER, M. Survey of heavy metal deposition at the schulterberg by using basidiomycetes as bioindicators. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v. 35, n. 4, p. 155-162, 1996.
- PEREGO, P.; HOWELL, S. B. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 147, p. 312-8, 1997.

PETERS, R. W.; YOUNG, K.; BHATTACHARAYAN, D. Evaluation of recent treatment technique for removal of heavy metals from industrial wastewater. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 81, p. 1695-1703, 1985.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. London: Blackie Academic Professional, 2009. 519p.

PORCELA, D. B. Mercury in the Environment: Biogeochemistry. In: WATRAS, C. J.; HUCKABEE, J. W. (Ed.) Mercury pollution: integration and synthesis. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, p.2-7.

PREUSS, H. G.; ECHARD, B.; PERICONE, N. V.; BAGCHD, I.; YASMIN, T.; STOHS, S. J. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102 , p. 1986-1990, 2008.

QUINA F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RAUSER, W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 31, p. 19-48, 1999.

REGINE, H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution. **Int. Microbiol.**, v. 3, p. 17-24, 2000.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270,1950.

RIVERA-BECERRIL, F.; CALANTZIS, C.; TURNAU, K.; CAUSSANEL, J. P.; BELIMOV, A.A.; GIANINAZZI, S.; STRASSER, R. J.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1177-1185, 2002.

SADEGHIS.; ZERAATKAR, A.; MOGHADDAM, The procedure to reach accumulation of heavy metals. **Talanta**, v. 99, p. 758-766, 2012.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. Transformation of yeast. **Curr. Genet.**, v.16, p. 339-346, 1989.

SHOAI, A.; ASLAM, N.; ASLAM, N. Myco and Phyto Remediation of Heavy Metals from Aqueous Solution. **The Online Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 3, 2012.

SHRIVASTAVA, H. Y.; NAIR, B. U. Chromium (III) mediated structural modifications of glycoprotein–Impact of ligand and the oxidants. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 285, p. 915-920, 2001.

SILVA, R. R. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores, *Quim. Nova*, v. 6, p. 7-15, 2009.

SINHA, A.; KUMAR, S.; KHAR, S. K. Biochemical Basis of Mercury Remediation and Bioaccumulation by *Enterobacter* sp. EMB21. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 169, p. 256-267, 2013.

THIPPESWAMY, B.; SHIVAKUMAR, C. K.; KRISHNAPPA, M. Study on heavy metals biosorption ability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. Journ. Biol. Research**, v. 2, n. 2, p. 106-115, 2014.

VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F.; Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. **Waste biomass Bioprocess. Eng.**, v.22, p. 171-173, 2000.

VEGLIO, F.; BEOLCMI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **J Hydrometall.**, v. 74, p. 301–316, 1997.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. **Biosorption of Heavy Metals**. v. 1, p. 3-5, 1990.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 797-806, 1995.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Effect of pre-treatment on the of heavy metals on *Mucor rouxii*. **Water SA.**, v. 26, p. 119–123, 2000.

WANG, J. L.; CHEN, C.; Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 2, 195-226, 2009.

WANG, L.L.; WANG, J.Q.; ZHENG, Z.X.; XIAO, P. Biosorption of heavy metals. **J. Hazard. Mater.**, v. 177, p. 114-118, 2010.

ZABEL, T. F. Diffuse sources of pollution by heavy metals. **Journal of the Institution of Water Environmental Management**, v.7, p.513-520, 1993.