

EFEITOS DA APLICAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia
lipolytica* NA PLANTA AQUÁTICA *Salvinia auriculata*
AUBLET SOB ESTRESSE POR MERCÚRIO

Edson Soares Stellet Mariano

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES
JULHO-2022

EFEITOS DA APLICAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* NA PLANTA AQUÁTICA *Salvinia auriculata* AUBLET SOB ESTRESSE POR MERCÚRIO

Edson Soares Stellet Mariano

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES
JULHO-2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

M333 Mariano, Edson Soares Stellet.

EFEITOS DA APLICAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* NA PLANTA AQUÁTICA *Salvinia auriculata* AUBLET SOB ESTRESSE POR MERCÚRIO / Edson Soares Stellet Mariano. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

51 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.
Orientadora: Aline Chaves Intorne.

1. Metal tóxico. 2. Contaminação ambiental. 3. Interação planta e microrganismo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

EFEITOS DA APLICAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* NA PLANTA AQUÁTICA *Salvinia auriculata Aublet* SOB ESTRESSE POR MERCÚRIO

Edson Soares Stellet Mariano

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovado em 29 de Julho de 2022

Comissão examinadora:

Lia Teixeira
Drª Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira (UERJ)

Vergílio
Drª Cristiane dos Santos Vergílio (UFES)

Marina Suzuki
Drª Marina Satika Suzuki (UENF)

Aline Chaves Intorne
Drª Aline Chaves Intorne (Orientadora)

Dedico este trabalho a minha família e minha esposa Bruna da Conceição Braz de Jesus por todo apoio.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas sim o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), pela estrutura para realização deste trabalho, à CAPES pelo apoio financeiro, aos docentes do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal com seus ensinamentos.

Aos meus colegas do laboratório com quem convivi durante este trabalho, principalmente, a Jussara Tamires de Souza Silva e Moara Cardoso de Freitas.

À minha orientadora, professora Aline Chaves Intorne, pela oportunidade da realização do trabalho e apoio a minhas novas etapas de crescimento.

Aos membros da banca Dr. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira, Cristiane dos Santos Vergílio e Marina Satika Suzuki, pelas contribuições no trabalho.

À minha família, que sempre me incentiva e me apoia nas minhas decisões.

Ao meu tio, Itamar de Araújo Fernandes (*in memoriam*).

À professora Marina Satika Suzuki do Laboratório de Ciências Ambientais, por me esclarecer algumas dúvidas quando necessárias e apoio com uso de equipamentos do Laboratório de Ciências Ambientais (LCA).

À secretaria Margareth Paes, aos técnicos do laboratório, às funcionárias da limpeza e aos vigilantes da UENF.

SUMÁRIO

RESUMO.....	.XI
ABSTRACT.....	.XII
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Ambiente aquático e contaminação por mercúrio.....	15
2.2. Biorremediação em ambiente aquático.....	17
2.3. <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....	19
2.4. <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
3. REVISÃO EM BANCOS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL.....	22
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo geral.....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. METODOLOGIA.....	25
5.1. Material biológico.....	25
5.2. Meio de cultura da levedura.....	25
5.3. Ativação das células da levedura.....	25
5.4. Preparo da cultura estoque.....	26
5.5. Fermentação.....	26
5.6. Cultivo da planta aquática	26
5.7. Solução metálica.....	27
5.8. Ensaio de planta com Hg.....	27
5.9. Ensaio de interação planta-microrganismo.....	27
5.10. Desenvolvimento da planta.....	28
5.11. Extravasamento de eletrólitos.....	28
5.12. Determinação de pigmentos.....	29
5.13. Análise estatística.....	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1 Resistência a Hg em <i>S. auriculata</i>	30
6.2. Cinética de crescimento de <i>Y. lipolytica</i>	31
6.3. Intereração planta-microrganismo e mercúrio.....	32
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
9. APÊNDICE.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo do mercúrio no ambiente aquático.....	16
FIGURA 2. Interações de uma célula microbiana com metais.....	18
FIGURA 3. Processos de fitorremediação de metais.....	18
FIGURA 4. A macrófita aquática <i>S. auriculata</i> Aubl.....	20
FIGURA 5. Ensaio de exposição a Hg em <i>S. auriculata</i>	27
FIGURA 6: Ensaio de interação planta-microrganismo sob estresse com Hg.....	28
FIGURA 7. Resposta de <i>S. auriculata</i> à diferentes concentrações de $HgCl_2$	30
FIGURA 8. Fermentação para inóculo.....	32
FIGURA 9. Biomassa fresca da planta inoculada exposta a Hg.....	33
FIGURA 10. Biomassa seca da planta inoculada exposta a Hg.....	34
FIGURA 11. Danos as membranas celulares da planta sob estresse com Hg.....	35
FIGURA 12. Taxa de crescimento da planta inoculada exposta a Hg.....	36
FIGURA 13. Clorofila a da planta inoculada exposta a Hg.....	37
FIGURA 14. Clorofila b da planta inoculada exposta a Hg.....	38
FIGURA 15. Carotenóides da planta inoculada exposta a Hg.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Patentes relacionadas ao presente trabalho.....	23
TABELA 2. Composição do meio de cultura LB modificado.....	25
TABELA 3. Solução nutritiva para manutenção das plantas.....	26
TABELA 4. Dados brutos curva de crescimento da levedura.....	49
TABELA 5. Dados brutos das análises em planta.....	50
TABELA 6. Estatística das análises em planta.....	51

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

BF - Biomassa fresca

BS - Biomassa seca

Ca (NO₃)₂.4H₂O - Nitrato de cálcio tetra-hidratado

CE1 - Condutividade elétrica inicial

CE2 - Condutividade elétrica final

CH₃Hg⁺ - Metil mercúrio

D.O - Densidade Óptica

EE - Extravasamento de eletrólitos

FeCl₃ EDTA - Cloreto de ferro

Hg⁰ - Mercúrio elementar

Hg²⁺ - Mercúrio divalente

HgCl₂ - Cloreto de mercúrio

KNO₃ - Nitrato de potássio

LB - Luria-Bertani

MgSO₄. 7H₂O - Sulfato de magnésio hepta-hidratado

NH₄H₂PO₄ - Fosfato de amônio

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal traço não essencial aos organismos, tóxico mesmo nas menores concentrações. Nas últimas décadas, a disponibilidade de Hg tem aumentado em decorrência de atividades da indústria, mineração e agricultura, causando impactos negativos nos corpos hídricos, seja pelo lançamento de efluentes ou pelo escoamento da água superficial. Para minimizar tais impactos, estratégias de biorremediação utilizando plantas como *Salvinia auriculata* Aublet, que tem alta tolerância a metais, juntamente com microrganismos como *Yarrowia lipolytica*, uma levedura que possui capacidade de bioassorção de metais, pode oferecer benefícios para o tratamento de áreas contaminadas. Neste sentido, o trabalho avaliou o efeito da inoculação de *Y. lipolytica* UENF-F em *S. auriculata* sob estresse causado por Hg. Para tanto, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação com solução nutritiva de Hoagland ¼ por 7 dias. Em seguida, foi utilizado 500 mL de solução nutritiva e 1 g de planta nos tratamentos: T1) planta (controle) e T2) planta + *Y. lipolytica*, T3) planta + *Y. lipolytica* + Hg e T4) planta + Hg. Este ensaio foi realizado por 4 dias em casa de vegetação. No quarto dia foi realizada a troca da solução nutritiva e adicionado aos tratamentos T3) e T4) 0,7 mg L⁻¹ de Hg. Após mais 4 dias foram avaliados os parâmetros: biomassa fresca (BF), biomassa seca (BS), extravasamento de eletrólitos (EE), teor de clorofila a, clorofila b e carotenoides. Para análise estatística foi utilizado Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Como resultado, foi observado incremento de (47%) de BF nas plantas inoculadas (T2) comparado às plantas não inoculadas (T1). Neste contexto, para BS, também se obteve incremento de 27% em (T2). Já as plantas previamente inoculadas e transferidas para solução contendo Hg (T3) tiveram incremento de (54%) de BF, comparado a (T4). Comparando plantas não inoculadas (T1) com plantas inoculadas (T2) houve aumento de (62%) no teor de clorofila a, (80%) clorofila b e (93%) de carotenóides. Na comparação de plantas sob estresse por Hg (T4) com plantas inoculadas e adição de Hg (T3) foi observado aumento significativo do teor de clorofila a (85%), clorofila b (473%) e carotenóides (171%) em (T3). Na análise de EE, foi verificado aumento na presença de Hg sem a levedura (T4) comparado com o tratamento com levedura (T3) em (98%). Desta forma, a aplicação de *Y. lipolytica* UENF-F em *S. auriculata* mostrou que a cepa foi capaz de proteger a planta do estresse causado por Hg, sendo a concentração usada muito acima do permitido pelo CONAMA, sugerindo que esta interação tem potencial para ser aplicada como uma alternativa para uso em processos de biorremediação.

Palavras-chave: Metal tóxico, contaminação ambiental, interação planta e microrganismo

ABSTRACT

The Mercury (Hg) is a trace metal not essential to organisms, it is toxic even in low concentration. On the past few decades, Hg availability has been increasing because of industry, mining and agriculture activities, causing negative impact to water bodies, either by effluent release, or by superficial water flow. In order to minimize such impacts, bioremediation strategies using plants as *Salvinia auriculata Aublet*, which, in has high tolerance to metals, along with microorganisms as *Yarrowia lipolytica*, an yeast able to bioabsorb metals, can offer benefits for the treatment in contaminated areas. In this sense, this paper assessed the inoculation effect of *Y. lipolytica* UENF-F in *S. auriculata*, under stress caused by Hg. To do such, plants have been acclimatized at a vegetation house, with a nutritive solution of Hoagland ¼ for 7 days. After this period, it was used 500 mL of nutritive solution and 1g of plants in these treatments: T1) plant (Control) and T2) plant + *Y. lipolytica*, T3) plant + *Y. lipolytica* + Hg and T4) plant + Hg. This trial was carried out for 4 days in a vegetation house. By the fourth day, a replacement on the nutritive solution occurred, and 0,7 mg L⁻¹ of Hg was added to the T3) and T4) treatments. After 4 more days, these parameters were evaluated: fresh biomass (FB), dry biomass (DB), electrolyte leakage (EL), chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids content. For a statistical analysis, a Tukey's Test at 5% probability was used. As a result, it was observed an increase of (47%) in FB on inoculated plants (T2), compared to not inoculated plants (T1); In this sense, for DB, there was also an increase of 27% in (T2). As for the previously inoculated plants and transferred to the solution containing Hg (T3), there was a 54% increase on FB, compared to (T4). Comparing not inoculated plants (T1) to inoculated plants (T2), there was an increase in the contents of (52%) on chlorophyll a t, (80%) chlorophyll b and (93%) on carotenoids. When comparing plants under stress by Hg (T4) to inoculated plants and Hg addition (T3), it was noticed a significant increase in the contents of chlorophyll a (85%), chlorophyll b (473%) and carotenoids (171%) in (T3). On the EL analysis, it was verified an increase in Hg presence without yeast (T4) compared to the treatment with yeast (T3) in (98%). This way, the application of *Y. lipolytica* UENF-F in *S. auriculata* has shown that the strain was able to protect the plant from the stress caused by Hg, with an utilized concentration much higher than the allowed by CONAMA, suggesting this interaction has potential to be applied as an alternative to be used in bioremediation processes.

Key-words: toxic metal; environmental contamination; plant-microorganisms interaction.

1. INTRODUÇÃO

A poluição do ambiente aquático por contaminantes potencialmente tóxicos tem sido motivo de preocupação para a sociedade nas últimas décadas. Em comparação com os contaminantes orgânicos, os processos de decomposição natural não removem metais, de modo que elementos como mercúrio (Hg) são acumulados, causando danos à saúde humana (HA et al, 2016; USEPA, 2015).

As fontes de emissões de Hg por fontes antropogênicas em 2015 ocorreram majoritariamente na Ásia, seguida pela América do Sul e África Subsaariana. Essas emissões introduziram cerca de 1.220 toneladas de Hg em ambientes terrestres e de água doce (GUZMÁN et al, 2020).

Somente no período de 2010 a 2013, o Brasil emitiu 39.214 kg de Hg para o ambiente, sendo a maior parte devida à mineração de ouro (22.500 kg) (UNEP, 2018). A contaminação dos corpos hídricos com Hg preocupa pelo consumo de pescado. As comunidades ribeirinhas, por exemplo, encontram-se extremamente expostas à bioacumulação desse metal (GOMES et al, 2021).

Na região Norte Fluminense, a seca de 2014 sobre a bacia do Rio Paraíba do Sul promoveu um aumento nos níveis de Hg total e metil mercúrio nos peixes (AZEVEDO et al, 2018). A avaliação de isótopos de C, N, Hg e Se em uma rede alimentar tropical do litoral norte do Rio de Janeiro mostrou que o Hg apresentou maior taxa de aumento na teia alimentar (KEHRIG et al, 2013). Sousa (2000) determinou a concentração de Hg nos sedimentos e solos de lagoas do norte do Estado do Rio de Janeiro. Dentre as lagoas estudadas, foram observadas as maiores concentrações de Hg na lagoa do Campelo em Campos dos Goytacazes.

A família de samambaias *Salvinaceae* apresenta a capacidade de hiperacumulação de metais (REZANIA et al, 2016). Estudos recentes de sequenciamento genômico mostraram que dois gêneros dessa família, *Azolla* e *Salvinia*, podem ser utilizados para entender a evolução das plantas aquáticas e a sua associação com microrganismos benéficos. O gênero *Salvinia* mostrou-se especialmente interessante para ser utilizado como organismo modelo de estudo para samambaias, uma vez que essas plantas possuem genoma pequeno, têm ciclo de vida curto e fácil cultivo no laboratório (LI et al, 2018).

Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa de Microbiologia Ambiental (UENF/IFRJ) também mostraram a eficácia da inoculação de microrganismos para promoção do crescimento de plantas aquáticas e proteção contra estresse causado por excesso de metais. Segundo Silva (2019), seus experimentos demonstraram que *S. auriculata* inoculada com uma cepa de *Enterobacter* teve aumento significativo de biomassa fresca e efeitos protetores ao estresse com cobre (Cu) na planta. Em outro trabalho, Orozimbo (2020) realizou a inoculação da bactéria *Bacillus toyonensis* em *S. auriculata* na presença de chumbo (Pb) e ocorreu a diminuição do EE nas células vegetais. A inoculação de *Y. lipolytica* nesta macrófita aquática em experimento para remoção de Cu, mostrou que a levedura minimizou os efeitos negativos causados pelo metal nas células vegetais (BARROSO 2018). Mais recentemente, o trabalho de Freitas (2022) mostrou a resistência a Hg em *Y. lipolytica* UENF-F em concentrações muito elevadas de Hg, com crescimento em 150 µmol L⁻¹ de HgCl₂ (equivalente a 30 mg/L de Hg).

O presente trabalho buscou ampliar as pesquisas com a interação da levedura *Y. lipolytica* e a planta aquática *S. auriculata*, no sentido de avaliar e explorar sua capacidade de resistir a Hg, um metal perigoso, altamente tóxico e contaminante nos ambientes aquáticos. O potencial de tal microrganismo para promover o crescimento vegetal foi avaliado na intenção de aliar essa característica com a resistência a Hg e impulsionar estudos de biorremediação. Pesquisas envolvendo plantas aquáticas e leveduras ainda são escassas na literatura. Dessa forma, buscamos compreender melhor essa interação e os benefícios que ela pode gerar a fim de encontrar alternativas novas para serem aplicadas na biorremediação de metais tóxicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ambiente aquático e a poluição por mercúrio

O monitoramento da qualidade da água é um dos principais instrumentos de sustentação de uma política de planejamento e gestão de recursos hídricos, visto que funciona como um sensor, possibilitando o acompanhamento do uso dos corpos hídricos e seus efeitos sobre as características qualitativas e quantitativas das águas, de modo a subsidiar ações de controle ambiental (GUEDES DA SILVA et al, 2012). Neste sentido, a urbanização acelerada e sem o devido planejamento aumentou a pressão antrópica sobre os recursos hídricos, sobretudo no que se refere àqueles usados para o abastecimento urbano. Isso gerou numerosos impactos negativos sobre esse recurso natural, principalmente, por meio do lançamento de esgotos e de resíduos urbanos e industriais nas águas (SILVA et al, 2018).

Dentre os resíduos industriais prejudiciais está o Hg em geral, a forma dominante de Hg na água, no solo e no sedimento é a inorgânica como Hg^{2+} (II), enquanto o metilmercúrio (CH_3Hg^+) está majoritariamente presente na biota e na atmosfera (CONZA, 2017). As fontes naturais mais significativas de Hg são intemperismo de minerais, erosão e atividade vulcânica, enquanto as fontes antropogênicas dependem de atividades como mineração, fundição, galvanoplastia, uso de pesticidas e descarga de fertilizantes fosfatados, bem como biossólidos (por exemplo, lodo de esgoto) e deposição atmosférica (DIXIT et al, 2015). Dentre as formas inorgânicas, destaca-se o cloreto de mercúrio (HgCl_2), muito utilizado em cosméticos, inseticidas e tintas (FARDIN, 2019).

A toxicidade desses metais tem sido uma preocupação, considerando que eles não são removidos dos ecossistemas aquáticos por autopurificação e se acumulam em partículas suspensas e sedimentos, potencialmente ameaçando a saúde humana e ecossistemas através da teia alimentar (ARANTES et al, 2016). No caso do Hg, (Figura 1) apresenta o Ciclo global do Hg e os processos biogeoquímicos envolvidos.

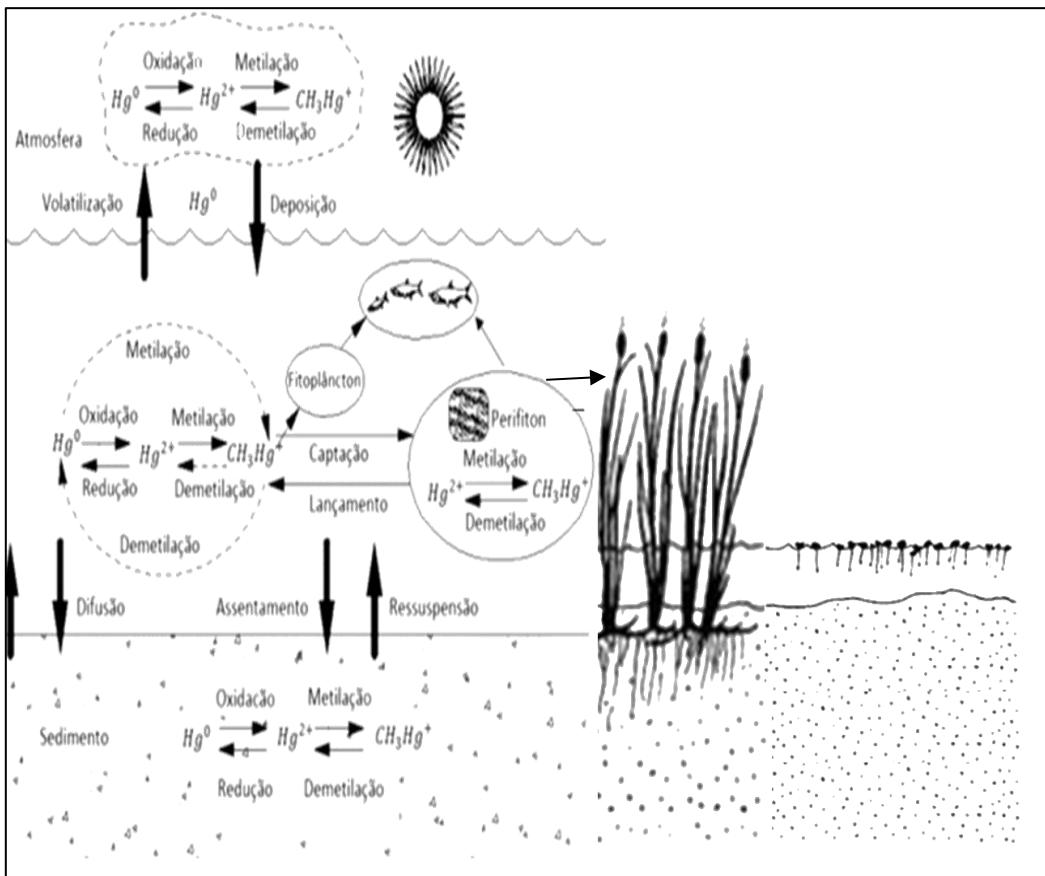


Figura 1: Ciclo do mercúrio no ambiente aquático. Hg^0 (mercúrio elementar), Hg^{2+} (mercúrio divalente), CH_3Hg^+ (metilmercúrio). Fonte: Adaptado de CONZA, 2017. Plantas aquáticas adaptadas de: BRIX e SCHIERUP, 1989.

No ciclo representado na Figura 1, o Hg pode ser transportado e distribuído de fontes terrestres e atmosféricas para os sistemas hídricos e vice-versa. Nos oceanos, rios e lagos, em ambientes aquáticos se dá o chamado "Ciclo Local" do Hg, onde ocorre a metilação do metal. O Hg então entra na cadeia trófica, sofrendo biomagnificação de um nível trófico para outro superior (KITAHARA et al, 2000).

A forma química mais tóxica identificada é o CH_3Hg^+ (MORGANO et al, 2005). Essa molécula é produzida em especial nos sedimentos, através de uma série de reações físicas, químicas e, principalmente, microbiológicas (Souza, 2014). A formação do composto orgânico de Hg inicia-se na cadeia alimentar através da difusão e forte ligação com as proteínas da biota aquática. Isso ocorre porque organismos aquáticos metilam o Hg elementar presente na água, no solo ou no ar (SILVA, 2020). Segundo a legislação brasileira, a concentração máxima permitida de Hg nas águas doces de Classe 1 e 3 é de 0,0002 mg/L e 0,002 mg/L, respectivamente (CONAMA, 2005).

A exposição humana aos compostos de Hg tem sido de grande preocupação pública devido à sua elevada toxicidade e associação com doenças neurológicas e motoras, renais, cardíacas, imunológicas, reprodutivas e genéticas (GOUVEIA et al, 2019). Nesse contexto, o homem, pelo consumo de alimentos, principalmente de pescado, torna-se vulnerável ao Hg, sendo necessário buscar formas de mitigar a contaminação pelo metal (KITAHARA et al, 2000).

2.2. Biorremediação em ambiente aquático

Um dos processos de tratamento mais eficientes para a remoção de metais é baseado no sistema de troca iônica. Todavia, esse tipo de tratamento é caro, pois os equipamentos e materiais utilizados requerem a importação de produtos (BRUZZI et al, 2019). Surge então como possibilidade a biorremediação e se destaca por vários fatores, entre eles o baixo custo e a reproduzibilidade em escala laboratorial para testar sua eficiência (MALLMANN et al, 2019).

Biorremediação é o processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados para remover ou reduzir poluentes no meio. É uma tecnologia inovadora para remoção de metais e a sua recuperação em águas e solos contaminados (FRIAS & SANTOS, 2020).

Uma vez que os microrganismos já possuem estratégias para sobreviver em habitats poluídos por metais, eles dispõem de diferentes mecanismos que podem ser explorados para biorremediação *ex situ* ou *in situ* (Figura 2). Alguns exemplos são: 1) a bioassorção, que ocorre quando os microrganismos adsorvem passivamente os íons metálicos sobre a superfície celular; 2) a bioacumulação, onde há internalização e complexação dos íons metálicos por meio de processos de transporte celulares; 3) a biotransformação, quando o microrganismo age sobre o metal solúvel, alterando suas características químicas, tanto na redução da toxicidade, quanto tornando-o insolúvel; e 4) a biomíneralização, que se dá pela excreção de substâncias microbianas, que provocam a precipitação dos metais (BRAUN et al, 2019; DIXIT et al, 2015).

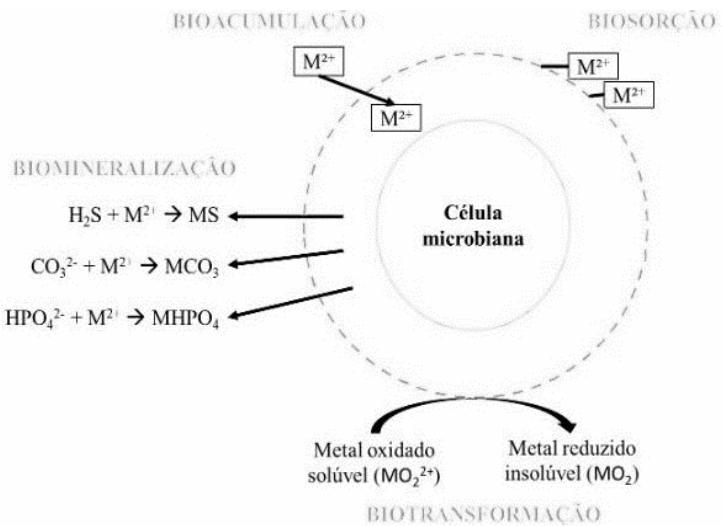


Figura 2: Interações de uma célula microbiana com metais. M^{2+} : metais. Fonte: Adaptado de BRAUN et al, 2019.

O uso de plantas para a descontaminação de metais, tem-se os processos de fitorremediação, destacando-se a fitoextração (Figura 3) (RODRIGUES et al, 2016), o metal é absorvido nas raízes, onde fica armazenado ou pode ser transportado, acumulando-se na parte aérea da planta, ou ainda volatilizando para a atmosfera - fitovolatilização (LIMMER; BURKEN, 2016; MAHAR et al., 2016). Outra técnica é a fitoestabilização, onde a biodisponibilidade dos metais é reduzida no ambiente pela sua imobilização mediada pelas plantas (CUNNINGHAM; OW, 1996; KHALID et al., 2017).

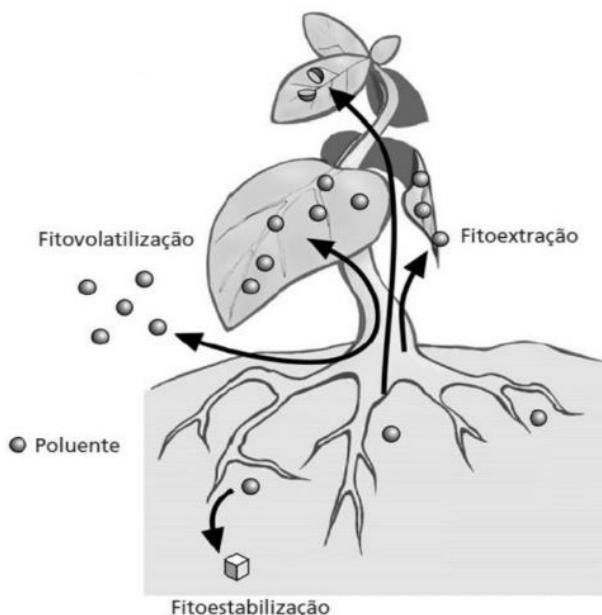


Figura 3: Processos de fitorremediação de metais. Fonte: Adaptado de SOUZA, 2012.

Os ecossistemas aquáticos oferecem muitas oportunidades para as plantas e microrganismos interagirem, favorecendo a biorremediação em uma ação conjunta (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016). Dentre as interações que plantas e microrganismos realizam no ambiente aquático, a bioatividade microbiana pode ajudar na promoção do crescimento vegetal, como: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitormônios, produção de enzimas e supressão de patógenos (MEIRELHES, PEREZ e DE LARA, 2022). E em geral, essa interação resulta em benefícios mútuos. As plantas também auxiliam os microrganismos fornecendo abrigo e carbono orgânico. Dessa forma, estes retornam minerais e metabólitos necessários para o crescimento vegetal e a proteção contra estresses ambientais (SRIVASTAVA et tal, 2017).

2.3. *Salvinia auriculata* Aublet

Macrófitas aquáticas são plantas de grande importância para o ecossistema aquático. Elas contribuem para a síntese de matéria orgânica nesses ambientes, participando da ciclagem e estocagem de nutrientes, do controle da poluição e da eutrofização artificial (SANTOS, 2018).

No Brasil, a classificação comumente aceita sobre as macrófitas aquáticas refere-se à variação tipológica: macrófitas aquáticas submersas enraizadas ou fixas; macrófitas aquáticas submersas livres; macrófitas aquáticas com folhas flutuantes ou flutuantes fixas; macrófitas aquáticas flutuantes livres; macrófitas aquáticas emergentes ou emersas; anfíbias e epífitas (TRINDADE et al 2010).

Em ambientes tropicais sul-americanos, as macrófitas aquáticas se desenvolvem ao longo de todo ano. O regime de altas temperaturas e luminosidade é favorável ao crescimento dessas plantas, que são capazes de acumular íons metálicos facilmente, removendo-os da solução e do sedimento por meio de processos de biossorção e bioacumulação (FREITAS et al, 2017), sendo indicadas para manutenção da qualidade ambiental (CAMPÓ et al, 2020). Algumas podem absorver metais tanto pelas raízes quanto por suas folhas (CAMPÓ et tal, 2020).

S. auriculata Aubl é uma planta aquática pteridófita flutuante livre (Figura 4), muito comum em água doce (WOLF et al, 2009). Possui rápido crescimento e propagação de forma vegetativa, formando densos estandes em lagoas e canais. Encontrada em regiões com clima tropical ou temperado, é uma planta

capaz de tolerar, absorver e translocar altos níveis de metais que seriam tóxicos a outros organismos (NEGRÃO; SOUZA; BUTIK, 2021). Metais como zinco (Zn), Pb, cromo (Cr), níquel (Ni), Cu e cádmio (Cd) foram encontrados em altas concentrações em tecidos de *S. auriculata* presentes naturalmente em corpos d'água (AYALA-LUNA et al, 2019; SCHWANTES et al, 2019). *S. auriculata* já tolerou $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hg (CASAGRANDE et al, 2018). Dessa forma, a referida espécie atua de forma excepcional no tratamento de ambientes contaminados por metais, suportando ainda variações climáticas em estações de secas ou cheias (LIMA et al., 2018). No trabalho de Gomes et al (2019) *S. auriculata* foi indicada como alternativa para biorremediação.

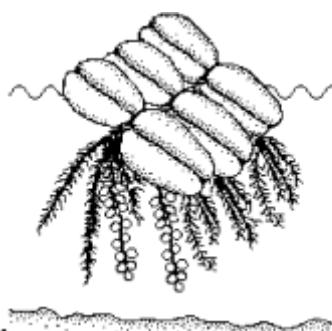


Figura 4: A macrófita aquática *S. auriculata* Aubl. Fonte: Adaptado de COELHO; LOPES; SPERBER (2005).

2.4. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é uma levedura oleaginosa ascomiceta com “status geralmente considerado seguro”, porque não é reconhecida como patogênica (WANG et al, 2020). Tem como característica metabolizar uma ampla variedade de fontes de carbono hidrofóbicas e hidrofílicas (ABDEL-MAWGOUD et al, 2018). Como uma levedura oleaginosa, o seu metabolismo é preparado para a biossíntese de triacilglicerídeos quando cultivada em condições limitadas de nutrientes (SPAGNUOLO et tal 2018). Possui dimorfismo que é a capacidade do fungo de crescer de duas formas (levedura e filamentosa) (SOUZA et al 2021). *Y. lipolytica* também pode mudar sua morfologia celular de levedura oval para pseudo-hifa ou hifa em resposta a estímulos ambientais (SHU et al 2021). Por isso, essa levedura vem sendo considerada um excelente modelo para estudos de dimorfismo (BANKAR et al. 2018).

Os estudos com *Y. lipolytica* mostram o seu potencial biotecnológico quanto à produção de enzimas, ácido cítrico e consumo de oleatos, alcanos, ácidos

graxos e glicerol bruto (MENDES-SILVAA et tal 2018). Por ser um organismo modelo, *Y. lipolytica* é utilizada em pesquisa de forma controlada, padronizada e previsível, benefícios que podem acelerar novos experimentos científicos com um menor custo (LARROUDÉ et al 2018).

Y. lipolytica também foi relatada como bioassorvente ou desintoxicante de metais, como Cr, Ni e Cu (OYETIBO et al., 2015). A levedura resistiu até 32 mg L⁻¹ de Hg (OYETIBO et al., 2015). Essa capacidade pode ser implementada para remover metais de águas residuais bem como na biolixiviação de metais (DARVISHI et al 2017). Também já foi descrito que *Y. lipolytica* contribuiu positivamente no desenvolvimento da microbiota associada à rizosfera vegetal e na promoção de crescimento de populações de bactérias que degradam hidrocarbonetos, além de produzir compostos indólicos, solubilizar fosfato, e interagir com mais uma variedade de íons metálicos (BARROSO, 2018; COGO et tal, 2018; ZINJARDE et al 2014). Portanto, a levedura *Y. lipolytica* tem grande potencial como agente de biorremediação multifuncional para o tratamento simultâneo de metais tóxicos e hidrocarbonetos em ambientes aquosos (WANG et al 2020).

3. REVISÃO EM BANCOS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Com intuito de encontrar patentes relacionadas a biorremediação de ambientes aquáticos poluídos com metais, que utilizassem microrganismos (leveduras) e plantas, foi feita uma busca em bancos de propriedade intelectual. Foram utilizadas as seguintes bases de dados:

- 1) ESPACENET (Rede de pesquisa em patentes de diferentes países, mantida pelo Escritório Europeu de Patentes),
- 2) LATIPAT (Base de dados de patentes publicadas por entidades da Espanha e América Latina.),
- 3) PATENTSCOPE (Portal mantido pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual),
- 4) INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial)
- 5) GOOGLE PATENTS (Portal mantido pelo Google).

A busca foi realizada utilizando os termos em inglês: *bioremediation*, *water*, *heavy metals*, *microorganism*, *yeast*, *plants*, *Yarrowia* e *Salvinia*. Ao pesquisar com as palavras *bioremediation* e *microorganism* no ESPACENET, por exemplo, foram encontrados 176 resultados e ao adicionar o termo *water*, 174. Ao incluir *heavy metals*, o resultado reduziu para 69 patentes e com mais *yeast* e *plants*, foram encontradas 7 patentes. Somando-se os termos *Yarrowia* e *Salvinia*, não foram encontradas patentes relacionadas. A mesma análise na base LATIPAT encontrou um registro (BRPI1103394A2), mas que não se associa à biorremediação.

Na Tabela 1, são apresentados os resultados mais próximos ao presente trabalho que foram encontrados. Destaca-se a patente depositada no ESPACENET de número CN110586054A, publicada em 2019, que se refere a uma invenção para remoção de íons de metais pesados através de um adsorvente a partir de uma levedura e sua aplicação. Nesta invenção, é utilizada uma cepa da levedura *Y. lipolytica* de origem marinha.

A patente de número WO2014131931A1, publicada em 2014 e depositada no ESPACENET, refere-se a um procedimento criado para permitir a eliminação de metais pesados presentes em todos os corpos d'água com contaminantes do tipo industrial, urbano e agrícola, melhorando a qualidade final da água. No

produto são utilizadas espécies de plantas aquáticas junto com fungos e/ou bactérias anaeróbicas inoculadas nas raízes.

Tabela 1. Patentes relacionadas ao presente trabalho.

Título	Banco	Nº da Patente
Sistema de tratamento de efluentes através de biomassa de plantas aquáticas, aplicado na separação e remoção de óleos, graxas, metais e correlatos	INPI	PI 0605558-3A2
Processo de obtenção de absorvente orgânico industrial com plantas aquáticas e modo de aplicação	INPI	PI0602501-3A2
Adsorvente para remoção de metais pesados e aplicação	ESPACENET	CN110586054A
Dispositivo e método de biorremediação para adsorção contínua de íons metálicos adotando fermento ativo	ESPACENET	CN105621631A
Nova levedura de <i>Yarrowia</i> e método para tratar biologicamente águas residuais	GOOGLE PATENTS	JP2006042774A
Levedura modificada como método de biorremediação	ESPACENET	US20180237321A1
Método de restauração combinada de microrganismos vegetais para corpos d'água de cádmio e chumbo	ESPACENET	CN109704467A
Método de preparação e aplicação de agente microbiano composto multifuncional para manutenção de plantas aquáticas e biorremediação do corpo de água	ESPACENET	CN107162726A
Método de eliminação de metais pesados presente em água contaminada e dispositivo para implementação deste método	ESPACENET	WO2014131931A1
Método para reparar o solo alcalino salino poluído por metais pesados, combinando leveduras e plantas marinhas	ESPACENET	CN108311532A
Processo para a remoção de espécies metálicas de efluentes	ESPACENET	CN1113890A

Na maioria dos documentos encontrados, os registros estão voltados para o uso isolado de leveduras ou de plantas aquáticas, raramente foi feito o uso combinado desses organismos no mesmo processo. Diante disso, o desenvolvimento de inovações em biorremediação com microrganismos e plantas aquáticas é de grande relevância para solucionar a problemática da contaminação por metais. A revisão mostra que são poucos trabalhos de inovação depositados com esse propósito, embora haja potencial na interação de plantas aquáticas e leveduras.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inoculação da levedura *Y. lipolytica* UENF-F em *S. auriculata* Aubl., sob estresse por Hg, através de parâmetros de crescimento fisiológicos e bioquímicos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliar visualmente o cultivo da planta aquática *S. auriculata* Aubl. na presença de Hg;
- B. Obter a curva de crescimento da levedura *Y. lipolytica* UENF-F; para obtenção do midlog, que será usado nos experimentos;
- C. Realizar ensaios de interação da planta e com a levedura na presença e ausência de Hg;
- A. Avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento vegetal, o aparato fotossintético e a resposta antioxidante da levedura em promover o crescimento vegetal e proteger a planta *S. auriculata* sob estresse por Hg.

5. METODOLOGIA

5.1. Material biológico

A levedura *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F, chamada no presente trabalho como cepa UENF-F, foi isolada da planta aquática *Typha domingensis*. A coleta desta planta para isolamento microbiano foi realizada na lagoa do Campelo, que fica localizada entre os municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco do Itabapoana (Barroso, 2018).

As plantas de *S. auriculata* utilizadas foram coletadas na Lagoa do Jacú, em Campos dos Goytacazes - RJ. Essa coleta foi realizada em 2013 e desde então essas plantas são mantidas em casa de vegetação na UENF.

5.2. Meio de cultura da levedura

Para o cultivo da levedura, preparo de culturas estoques e inóculos foram realizados, utilizando o meio de cultura Luria-Bertani (LB) modificado (Tabela 2). Todos os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada e esterilizados a 121 °C por 15 min em autoclave. No cultivo em meio líquido, as culturas foram incubadas a 30 °C e 160 rpm em agitador orbital (Shaker SL-222, SOLAB, Piracicaba, Brasil). Para o meio sólido, foi adicionado 15 g de ágar L⁻¹. As placas de Petri foram incubadas em estufa microbiológica a 30 °C.

Tabela 2. Composição do meio de cultura LB modificado.

Reagente	Concentração (g/L ⁻¹)
Peptona de caseína	10,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Glicose	10,0
Ágar*	15,0

*Componente adicionado apenas ao meio sólido.

5.3. Ativação das células da levedura

A cepa, inicialmente estocada em óleo mineral à temperatura ambiente, foi inoculada em meio sólido para ativação das células. Em uma placa de Petri contendo o meio de cultura, foi adicionado $\cong 1 \mu\text{L}$ da cultura estoque. A placa foi

incubada em estufa bacteriológica por 24 h à 30 °C e depois estocada em geladeira a temperatura de 4 °C.

5.4. Preparo da cultura estoque

Para obtenção da cultura estoque, um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB modificado foi inoculado com uma colônia da levedura crescida em placa de Petri e incubado a 30 °C/160 rpm. Após atingir a fase exponencial de crescimento, que foi medida pela densidade ótica (D.O) a 600nm, com auxílio de um espectrofotômetro (SHIMADZU UV1800). Então, 800 µL desta cultura foi adicionado em tubos 1,5mL contendo 200 µL de glicerol 50% e armazenados em freezer a -20 °C e -70°C.

5.5. Fermentação

Para realização da curva de crescimento do inóculo foram colocados 500 µL da cultura estoque em frascos Erlenmeyer com chicana de 250 mL contendo 50 mL do meio LB modificado. Os frascos foram cobertos com mantas feitas com algodão e gazes e levados para incubação a 30 °C/160 rpm no agitador orbital. Foi realizado uma medida de D.O em espectrofotômetro. Posteriormente, durante a fermentação foi medida novamente a D.O a cada 2 h até atingir a fase exponencial de crescimento.

5.6. Cultivo da planta aquática

Na casa de vegetação, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva com ¼ da força iônica e pH 6,0 (HOAGLAND & ARNON, 1950). Na Tabela 3 é apresentado o preparo da solução para manutenção dessas plantas.

Tabela 3. Solução nutritiva para manutenção das plantas. Preparo de 15 L com água.

Reagente	Concentração	Volume
KNO ₃	1M	180mL
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1M	120mL
NH ₄ H ₂ PO ₄	1M	60mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5M	60mL
Solução de micronutrientes		60mL
FeCl ₃ EDTA	53,7M	30mL

Para os experimentos de plantas essas foram aclimatadas por sete dias em solução nutritiva nova, selecionando indivíduos saudáveis com o mesmo tamanho de folhas (BIZZO et al., 2014).

5.7. Solução metálica

A solução estoque do metal foi preparada na forma solúvel com HgCl_2 na concentração final de 4 g/L. O sal foi dissolvido em água ultrapura e acondicionado em frasco de vidro no laboratório.

5.8. Ensaio da planta com Hg

Foi realizado inicialmente um ensaio qualitativo de 4 dias para que fosse conhecido o dano causado pelo estresse por Hg na planta *S. auriculata* e assim selecionar uma das concentrações para os ensaios posteriores. No experimento, foram preparados 12 potes contendo 500 mL de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950) e foram adicionadas aos potes as concentrações 0, 0,5, 0,7, 15 e 30 mg/L HgCl_2 , com 4 g da planta em cada pote. Ao final, foi realizado o registro fotográfico do ensaio. A concentração selecionada para o ensaio foi 0,7 mg/L.

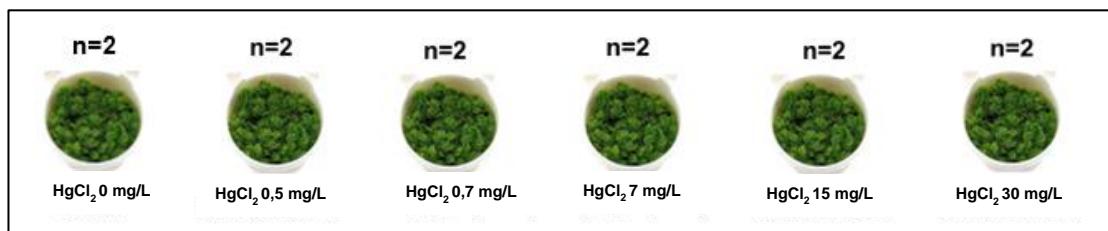


Figura 5: Ensaio de exposição a Hg em *S. auriculata*. Desenho experimental dos seis tratamentos analisados em duplicata.

5.9. Ensaio de interação planta-microrganismo

Para avaliar o potencial efeito da inoculação de *Y. lipolytica* UENF-F em *S. auriculata* sob estresse com Hg, foi montado um ensaio de interação planta-microrganismo. Cada unidade experimental foi composta por 1 g de planta em frascos plásticos contendo 500 mL de solução de Hoagland e Arnold $\frac{1}{4}$ da força iônica. As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: T1 (controle - somente planta), T2 (planta + levedura), T3 (planta + levedura + Hg), e T4 (planta + Hg). Os tratamentos continham 6 repetições cada (Figura 6).

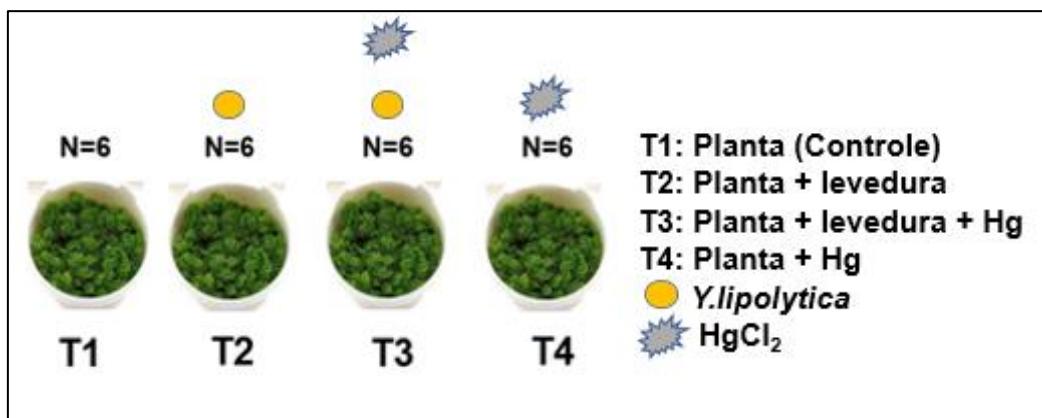


Figura 6: Ensaio de interação planta-microrganismo sob estresse com Hg. Desenho experimental dos quatro tratamentos analisados com seis repetições cada.

Nos tratamentos inoculados, a levedura foi cultivada até *midlog* e 1 mL do cultivo foi adicionado nos tratamentos T2 e T3. Para adaptação/aderência da levedura à planta, os frascos inoculados foram mantidos em casa de vegetação por um período de 4 dias. Posteriormente, a solução foi trocada e acrescentado 0,7 mg/L (HgCl_2) valor estipulado após resultado do ensaio da planta sob estresse com Hg (Figura 5). Os frascos permaneceram em casa de vegetação por mais 4 dias, totalizando 8 dias de experimentação. Foram realizados dois experimentos independentes.

5.10. Desenvolvimento da planta

Após ensaio de interação, foram avaliadas as variáveis das plantas ao final de cada experimento: biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS). Para tanto, as plantas foram recolhidas e secas em papel toalha por 10 min, sendo determinada a BF. Em seguida, o material vegetal foi colocado em estufa a 60 °C por 4 dias para determinação de BS (BIZZO et al., 2014). Os dois procedimentos foram realizados utilizando-se balança analítica (BEL, Engineering MG214i, Piracicaba, SP). Para avaliar a taxa de crescimento em porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula: $(\text{BF} * 100) / \text{Média dos tratamentos}$.

5.11. Extravasamento de eletrólitos

Os danos às membranas celulares da planta foram avaliados a partir do extravasamento de eletrólitos (EE) segundo descrito por Ben Hamed et al., (2007). Nesta análise, são considerados eletrólitos íons presentes no meio

intracelular, que são extravasados a partir da perda da integridade das membranas (LANGARO et al., 2014). Para tanto, as amostras de plantas (300 mg de BF) foram colocadas em tubos contendo 15 mL de água ultrapura incubados em banho-maria a 25 °C por 3 h, resfriados e depois mensurada a condutividade elétrica inicial (CE1). Então, as amostras foram aquecidas por 20 min a 96 °C para liberação de todos os eletrólitos. Após o resfriamento, a condutividade elétrica final (CE2) foi mensurada. O EE foi calculado de acordo com a equação: EE = (CE1/CE2) X 100.

5.12. Determinação de pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e total) e carotenóides foram determinados de acordo com Wellburn, 1994. Brevemente, folhas (50 mg) foram colocadas em tubos com 5 mL de dimetilsulfóxido e mantidas no escuro. Após 4 dias, o extrato foi analisado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em um ambiente de pouca luz para evitar degradação dos pigmentos.

5.13. Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados como média ± desvio padrão, além de serem analisados utilizando ANOVA, seguido pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) com o objetivo de determinar possíveis diferenças entre os tratamentos e o controle. Os programas computacionais Excel e GraphPad Prism foram utilizados para as análises estatísticas e apresentação dos resultados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Resistência a Hg em *S. auriculata*

Inicialmente, para avaliar qualitativamente a resposta de *S. auriculata* sob estresse com Hg, foi realizada a incubação da planta aquática com concentrações crescentes do metal por 4 dias, seguido pelo registro fotográfico. Como pode ser observado na Figura 7, ao testar cinco concentrações diferentes de Hg (0,5; 0,7; 7,0, 15 e 30 mg/L) em comparação com o tratamento controle sem adição do metal, foi possível observar que o crescimento das plantas foi inibido em 7,0 mg L⁻¹ com forte sintoma de toxicidade nas folhas (Figura 7D). Nas concentrações superiores, além da necrose, houve visualmente redução da biomassa fresca e clorose das folhas (Figura 7E e 7F). Já nas menores concentrações avaliadas (Figura 7B e 7C), foi possível verificar um leve dano nas folhas em comparação com o tratamento controle (Figura 7A), mas houve crescimento, mostrando que a planta é capaz de se desenvolver nessas concentrações de metal.

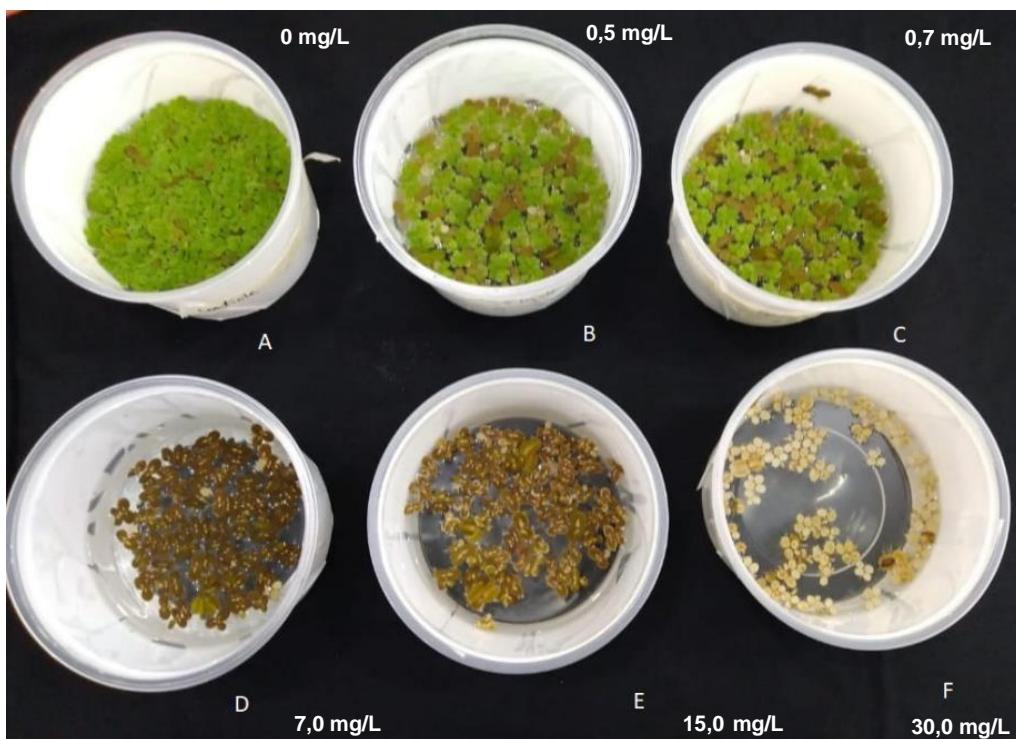


Figura 7: Resposta de *S. auriculata* à diferentes concentrações de HgCl_2 . A- Controle; B- 0,5 mg/L de Hg; C- 0,7 mg/L de Hg; D- 7,0 mg/L de Hg; E- 15,0 mg/L de Hg; F- 30,0 mg/L de Hg. O ensaio foi realizado em duplícata.

A partir desse ensaio, foi definido o uso da concentração de 0,7 mg/L de Hg a fim de avaliar a interação conjunta entre *S. auriculata* e *Y. lipolytica*. Sobre a levedura, a sua resistência a Hg foi esclarecida por Freitas (2022), mostrando que a cepa UENF-F é extremamente resistente ao metal tóxico, crescendo em concentrações elevadas de até 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HgCl_2 em meio LB líquido modificado, o equivalente a 30 mg/L de Hg, o dobro da concentração máxima testada na planta, mas sem sucesso. Oyetibo et al (2015) também estudaram a resistência e remoção de Hg pela levedura. Os resultados mostraram que *Y. lipolytica* foi capaz de remover o metal tóxico durante o crescimento em meio suplementado com 32 mg /L de Hg (OYETIBO et al, 2015).

Casagrande et al (2018), trabalhando com *Salvinia biloba* Raddi, encontrou que a planta consegue resistir facilmente a 0,2 mg/L de Hg, corroborando os dados obtidos no presente estudo. Segundo os autores, poucos sintomas de toxicidade em plantas vivas foram observados, evidenciando a resistência de *S. biloba* ao Hg e seu potencial uso como fitorremediador em corpos d'água contaminados por este metal. Eles também verificaram que a planta é capaz de remover o metal tóxico por bioacumulação e bioassorção (CASAGRANDE et al, 2018).

Desta forma, o resultado encontrado para *S. auriculata* se mostra bastante promissor, pois praticamente não houve diferença visível entre os tratamentos de 0,5 e 0,7 mg/L de Hg. Logo, novas concentrações acima dessas e menores que 3,5 mg/L podem ser analisadas.

6.2. Cinética de crescimento de *Y. lipolytica*

Antes de realizar o ensaio de interação da macrófita aquática com a levedura, foi necessário obter a curva de crescimento microbiano no laboratório (Figura 8). Assim, foi possível definir em que momento do cultivo, *Y. lipolytica* atingiu a *midlog*, sendo este o ponto de coleta das células escolhido para inoculação. Durante a *midlog* há intenso crescimento e produção de biomassa microbiana. A levedura está bem adaptada ao meio e com alta atividade metabólica, tendo também maior possibilidade de se multiplicar na planta.

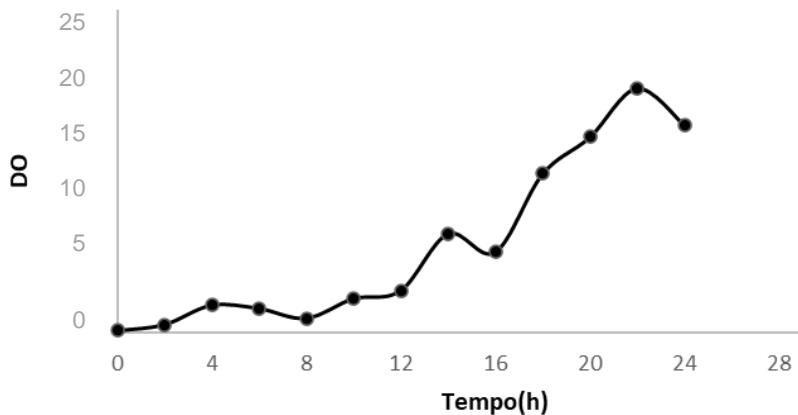


Figura 8: Fermentação para inóculo. A curva de crescimento foi realizada em um período de 26 h com retirada de alíquotas a cada 2 h para aferição da D.O em espectrofotômetro a 600 nm. A fermentação foi realizada com três repetições. Os dados brutos estão disponíveis na Tabela 4 do Apêndice.

A Figura 8 mostra o comportamento cinético de crescimento da levedura no meio LB modificado. Nas primeiras horas do cultivo, as células estão se adaptando ao meio, permanecendo assim até 12 h, quando iniciam a fase *log*, que se estende até às 22 h de cultivo. A partir de 24 h verifica-se a fase de declínio. Portanto, as células atingem *midlog* com 18 h de cultivo, com uma D.O igual a 16. Freitas (2022) observou o mesmo comportamento nos seus experimentos com a cepa UENF-F. Assim, foi definido nos tratamentos com a planta inoculada, usar sempre 1 mL de células coletadas no ponto de *midlog*.

6.3. Intereração planta-microrganismo e Mercúrio

Os metais tóxicos são um tipo de poluente, que é comum serem lançados em ambientes aquáticos por indústrias e atividades antrópicas. A espécie de levedura *Y. lipolytica* já foi isolada de locais naturais poluídos (BARROSO, 2018; JÄRUP et al, 2003). Então, conhecendo a elevada resistência da cepa UENF-F a Hg (FREITAS, 2022), foi avaliado no presente estudo a sua capacidade de proteger a planta aquática *S. auriculata* na presença 0,7 mg/L desse agente estressante.

Após a inoculação da levedura na macrófita, o experimento permaneceu 8 dias na casa de vegetação, sendo os últimos 4 dias na presença de Hg. Na presença e ausência do metal, foram avaliados em laboratório os parâmetros de

desenvolvimento (BF, BS e taxa de crescimento), EE e pigmentos (clorofila a, clorofila b, e carotenóides).

Na Figura 9, é observado que a inoculação da levedura (T2) aumentou a BF em 47% nas plantas inoculadas comparado às não inoculadas (T1). Já na presença do metal (T3 e T4), no âmbito do estresse, plantas inoculadas e transferidas para solução com Hg (T3) tiveram incremento de 54% de BF comparado ao tratamento sem a levedura (T4). Chama atenção ainda que comparado ao controle (T1), toda vez que a levedura foi inoculada, houve aumento significativo de biomassa, mesmo na presença de Hg, o que mostra a eficiência da levedura em promover o crescimento de *S. auriculata*.

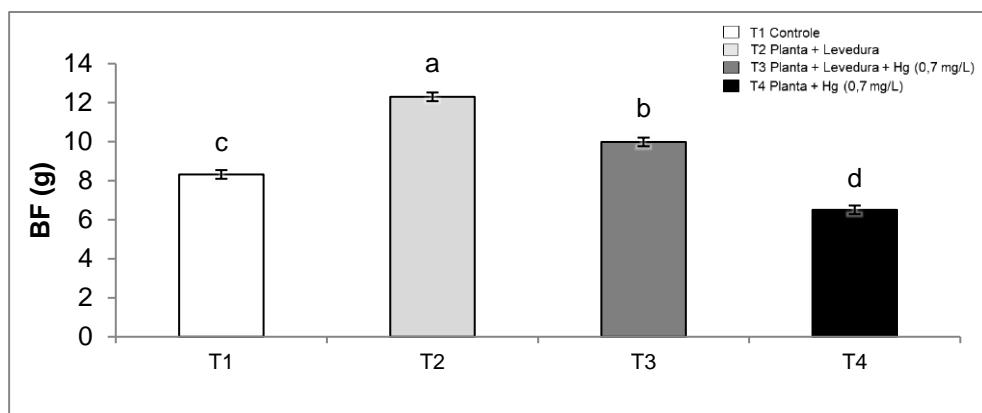


Figura 9. Biomassa fresca da planta inoculada exposta a Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram realizadas 6 repetições. As barras representam o desvio padrão. BF: biomassa fresca. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Para BS também se obteve incremento de 27% no tratamento planta + levedura (T2) em comparação ao controle (T1), reforçando o efeito promotor do crescimento de *Y. lipolytica* em *S. auriculata* (Figura 10). Quanto ao tratamento planta + Hg + levedura (T3) em comparação com o tratamento planta + Hg (T4), o aumento foi de 48%, confirmando um efeito protetor da levedura - altamente resistente a Hg, na planta. E mais uma vez, mesmo na presença de Hg em T3, a inoculação da levedura faz superar a produção de biomassa vegetal em comparação com T1 (Figura 10).

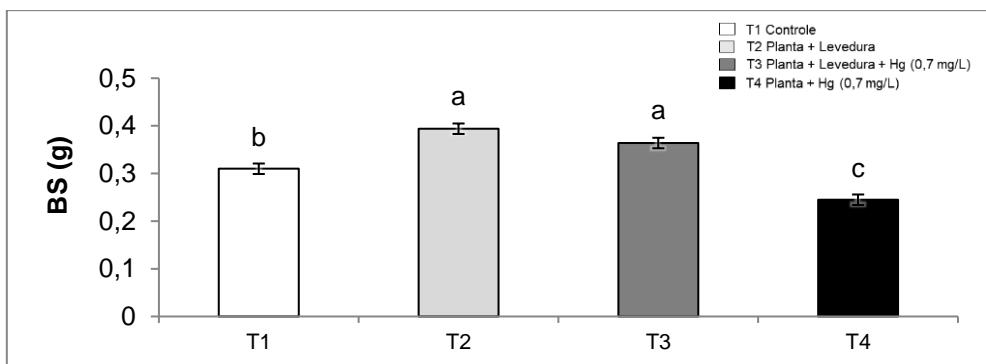


Figura 10: Biomassa seca da planta inoculada exposta a Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram realizadas 6 repetições. As barras representam o desvio padrão. BS: biomassa fresca. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Quando do isolamento da cepa *Y. lipolytica* UENF-F, foi verificado que a levedura é grande produtora de compostos indólicos (BARROSO, 2018). Compostos indólicos são precursores de hormônios vegetais como o ácido indol-acético, uma auxina que estimula o crescimento e a formação de raízes nas plantas, o que pode justificar os dados encontrados neste trabalho.

Barroso (2018), trabalhando com a mesma cepa, observou que *Y. lipolytica* UENF-F inoculada em *S. auriculata* na presença de Cu promoveu aumento de 26,3% na BS. Isto corrobora o efeito protetor da levedura sobre a planta em condição de estresse por metais. Estudos anteriores sobre a interação de bactérias benéficas e *S. auriculata*, envolvendo Cu e Pb, também observaram resultados semelhantes para a promoção do crescimento vegetal e proteção da planta sob estresse (OROZIMBO, 2020; SILVA 2019). Isto reforça a hipótese de que esses microrganismos em associação com a macrófita aquática desempenham um papel fundamental no ambiente e tem potencial para serem explorados biotecnologicamente.

Tanto para o parâmetro BF quanto para BS, apenas no tratamento planta + metal (T4) ocorreu diminuição na produção de biomassa, possivelmente, devido aos danos causados pelo excesso de Hg. Considerando que a mesma concentração do metal foi fornecida em T3, sem haver prejuízo na produção de biomassa, sugere-se que houve uma ação da levedura no sentido de diminuir os danos causados pelo Hg nesse tratamento. Por isso, foi avaliado os danos

causados as membranas celulares através da análise de EE nas plantas (Figura 11).

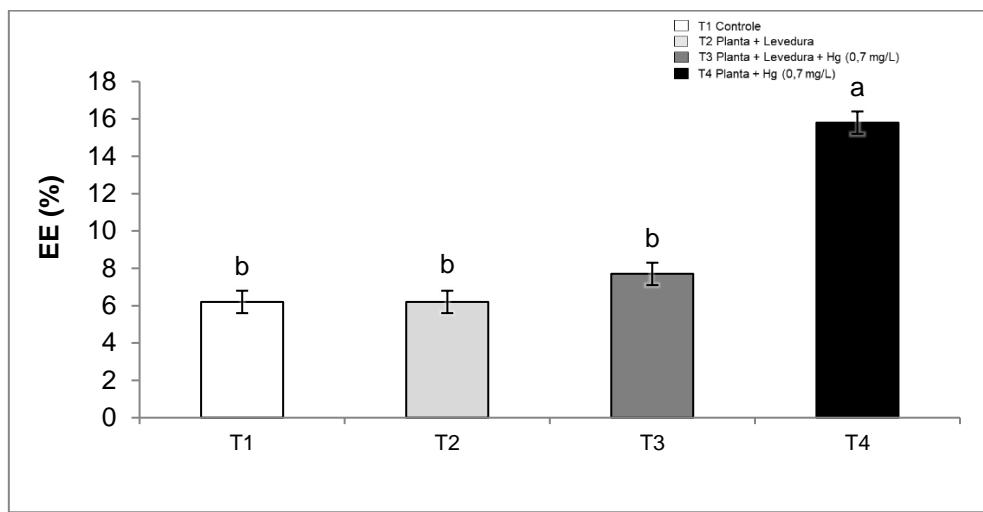


Figura 11. Danos as membranas celulares da planta sob estresse com Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. EE: extravasamento de eletrólitos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram realizadas 6 repetições. As barras representam o desvio padrão. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Ao analisar o EE nos tratamentos, observa-se que a integridade das membranas celulares foi parcialmente perdida em T4, onde houve 18% de EE, 12% acima do nível normal de íons extravasados em T1 e T2. Isto sugere que o estresse causado pelo metal afetou muito pouco as plantas, havendo integridade na maior parte das membranas celulares, corroborando que *S. auriculata* é resistente a Hg.

Um ponto importante a se considerar é que a diferença observada em T4 não se deve a um aumento da condutividade elétrica pela adição de íons de Hg a solução, uma vez que o EE em T3, que também teve adição de Hg, manteve-se em um valor menor e foi estatisticamente igual a T1 e T2. Na verdade, o que se verifica, é que a planta sem a presença da levedura e com Hg, teve aumento de 98% do EE comparado a T3. Logo, este resultado sugere que a cepa UENF-F na presença do metal, ajudou a diminuir o estresse na planta aquática.

Além disso, mais um outro ponto a se destacar, é que a presença da levedura em si não causa nenhum prejuízo a planta aquática, como pode ser visto em T2 e T3. Desta maneira, conclui-se também que a levedura não atua como patógeno para *S. auriculata*.

Segundo Elbaz et al (2010) a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma das principais causas de danos às membranas nas células vegetais. Em situações normais, as EROs geradas nas mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos são subprodutos controlados. No entanto, a presença de Hg leva a uma produção exacerbada dessas espécies reativas (ELBAZ et al, 2010).

Bizzo et al. (2014) encontraram resultado semelhante em *S. auriculata* sob estresse com Cu, mostrando aumento de 17% no EE, após 2 dias de ensaio. Segundo os autores, o maior vazamento de eletrólitos representa a extensão do dano da membrana biológica, que leva a redução de turgor, causando mudanças de elasticidades das paredes celulares (Bizzo et al, 2014).

O trabalho de Orozimbo (2020) também apresentou aumento de 31% no EE em *S. auriculata* na presença de Pb. Porém, esse percentual foi reduzido a 13,6%, quando a planta foi inoculada com uma bactéria promotora do crescimento vegetal, que parece ter agido protegendo a planta aquática do metal tóxico em excesso.

Na fitorremediação, a remoção do Hg da solução está relacionada à quantidade de biomassa, uma vez que a planta continua a se desenvolver mesmo na presença do metal, consequentemente maior é o acúmulo do Hg e a resistência (CASAGRANDE et al, 2018). Por isso, foi calculada ainda a taxa de crescimento de *S. auriculata* nas diferentes condições estudadas (Figura 12).

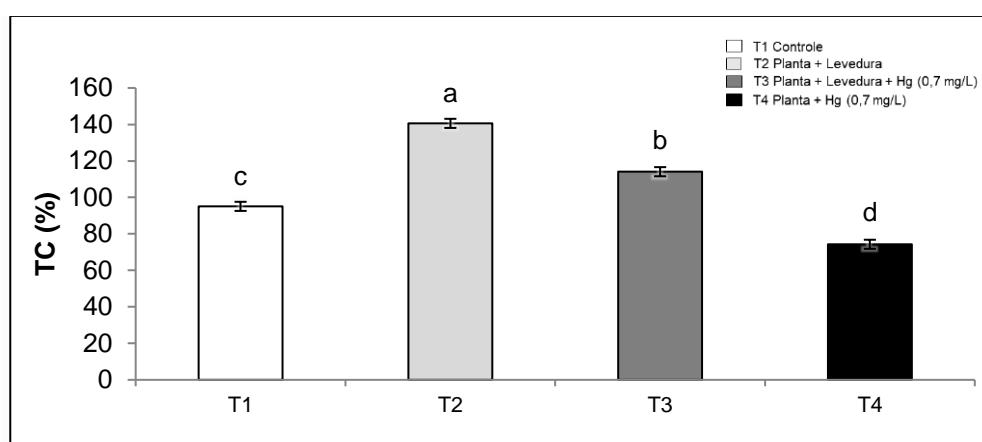


Figura 12: Taxa de crescimento da planta inoculada exposta a Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. TC: taxa de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram realizadas 6 repetições. As barras representam o desvio padrão. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Como pode ser observado, a TC é superior nos tratamentos inoculados, mesmo na presença de Hg, mostrando mais uma vez que a levedura é muito eficiente em promover o crescimento de *S. auriculata*. Além disso, o aumento da TC indica uma melhora no aparato fotossintético da planta, sendo analisado em seguida, a produção de pigmentos pela macrófita aquática inoculada na presença e ausência de Hg.

Na Figura 13, a determinação de clorofila a mostrou aumento de 62% no tratamento planta + levedura (T2) em comparação ao controle (T1), corroborando os dados obtidos de BF, BS e TC. Na avaliação do tratamento planta + Hg + levedura (T3) em comparação com T4, planta + Hg, houve aumento de 85% de clorofila a em T3. Possivelmente, a perda de clorofila a em T4 se deve aos danos causados pelo Hg nas enzimas relacionadas a fotossíntese. Já é sabido que o metal tóxico afeta as reações clara e escura, promovendo a substituição do átomo central de magnésio por Hg, impedindo a captação de luz nas moléculas de clorofila afetadas (PATRA, 2000). Por outro lado, a presença da levedura, mesmo na ausência de metal parece melhorar a fixação de carbono na planta, como sugeriu o dado de BS (Figura 10).

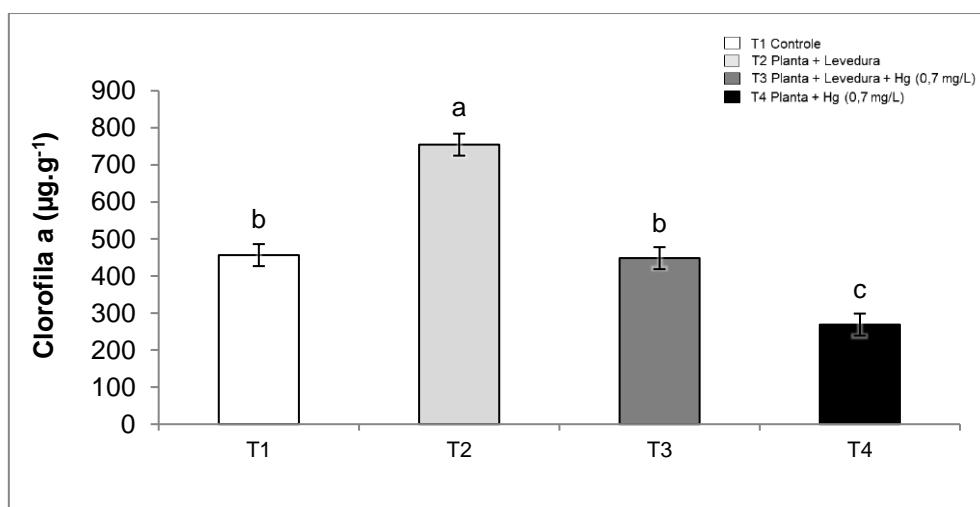


Figura 13: Clorofila a da planta inoculada exposta a Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram realizadas 6 repetições. As barras representam o desvio padrão. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Barroso (2018) mostrou que *S. auriculata* inoculada com *Y. lipolytica* UENF-F sob estresse com Cu apresentou aumento significativo ($p \leq 0,05$) de teor de

clorofila a (22,9%). Silva (2019) também mostrou aumento dos teores de clorofila a (18%) após inoculação da macrófita aquática com *Enterobacter sp* 3.1.3.0.X.18 na presença de Cu, corroborando os dados encontrados no presente trabalho.

Na Figura 14, para teor de clorofila *b*, foi observada uma redução drástica em T4. No entanto, a presença da levedura causou incremento de 80% ao se comparar T1 e T2. Na comparação do tratamento planta + Hg + levedura (T3) com controle também há uma tendência de aumento (Figura 14). Por isso, uma hipótese foi levantada a partir da análise dos dados de desenvolvimento da planta, EE e do teor de clorofila, de que a levedura pode estar ajudando a planta com respostas antioxidantes, melhorando a eficiência fotossintética de *S. auriculata*, o que resulta na promoção do crescimento vegetal e no alívio do estresse por Hg.

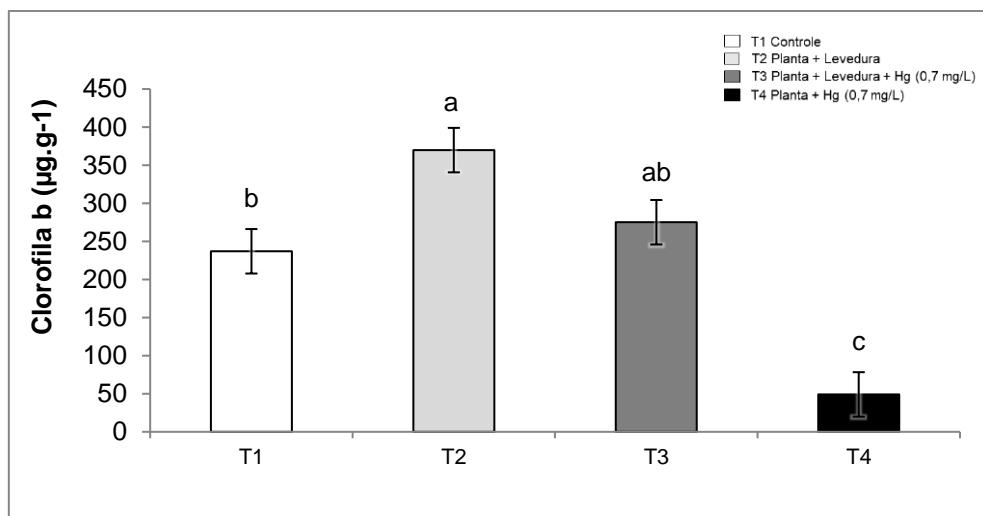


Figura 14: Clorofila *b* da planta inoculada exposta a Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Para responder se há alguma participação de vias antioxidantes quando da inoculação da levedura na planta, foi realizado a determinação de pigmentos do tipo carotenóides. Assim, na Figura 15, é possível observar como resultado da comparação do tratamento planta + levedura (T2) em relação ao controle (T1), o aumento de 93% desses pigmentos. No tratamento planta + Hg + levedura comparado com planta + Hg apenas, o aumento foi de 171% (Figura 15).

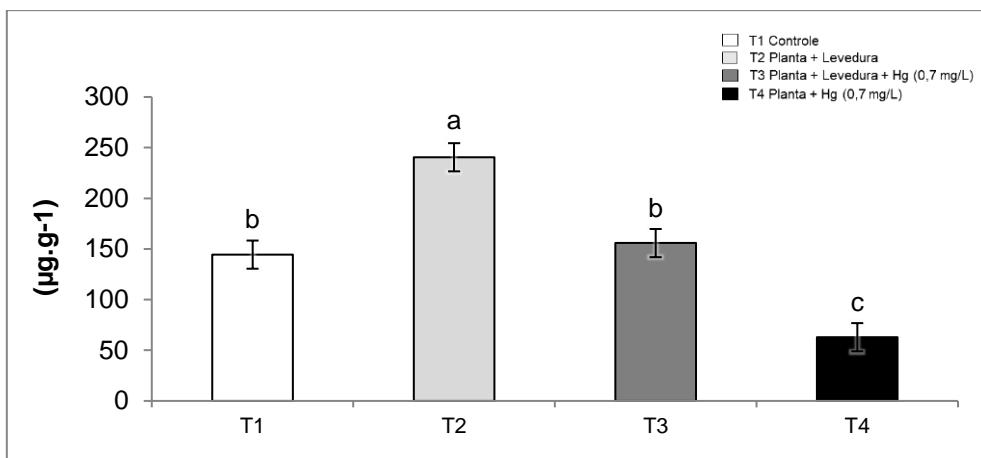


Figura 15: Carotenóides da planta inoculada exposta a Hg. T1: planta (controle), T2: planta + levedura, T3: planta + Hg + levedura; T4: planta + Hg. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão. Os dados brutos e as análises estatísticas estão disponíveis nas Tabelas 5 e 6 do Apêndice, respectivamente.

Os carotenóides podem atuar diretamente como antioxidantes, protegendo os lipídeos da membrana contra oxidação na planta sob estresse (GOMES, 2017). Isto corrobora a redução do EE na macrófita aquática inoculada com Hg observado anteriormente e a manutenção do crescimento da planta mesmo em condição de estresse.

No trabalho de Barroso (2018), a levedura *Y. lipolytica* UENF-F quando inoculada em *S. auriculata*, causou aumento de 15,7% do pigmento carotenóide. Os carotenóides são importantes para o vegetal, funcionando como pigmentos secundários, possuindo fator pró-vitamínico e protetor solar, que elimina radicais livres em tecidos (GOMES et al, 2014).

Bizzo et al (2014) descreveu que os carotenóides são compostos defensivos e caros energeticamente, o que só se compensa a vida em situação de estresse. Nas plantas expostas a metais, os carotenóides são reduzidos devido a inativação das enzimas que produzem esses pigmentos (RODRIGUES et al, 2016).

Y. lipolytica é um organismo-modelo, Bankar et al. (2009) já descreveram que a levedura dispõe de mecanismos interessantes, como enzimas (inulinases e alfa-manosidases) que protegem a célula contra estresse oxidativo. A produção de enzimas como fosfatases, redutases e superóxido dismutases também merecem uma menção especial (KOLHE et al, 2022). Dessa forma, trabalhos somente com a levedura, testaram a sua resposta a alumínio, mostrando que a formação de

filamentos foi inibida. Foram apresentados resultados para estresse com selênio (Se) e nanopartículas de ouro (Au), com *Y. lipolytica* mostrando-se resistente (BANKAR et al, 2009). Porém, o levantamento bibliográfico realizado não encontrou estudos sobre a interação dessa levedura com plantas, especialmente com este enfoque de biorremediação.

Microrganismos são reconhecidos por sua elevada resistência a metais tóxicos há muito tempo (GADD,1992). Todavia, ainda é preciso aprender mais para usar tal capacidade biotecnológica no tratamento de ambientes poluídos por esses contaminantes, buscando baixo custo e alta eficiência. A interação com plantas fitorremediadoras pode ser uma opção, para tanto, é preciso entender e explorar a inoculação. O presente trabalho traz luz a tais pesquisas.

7. CONCLUSÃO

- Este estudo, com inoculação de *Y. lipolytica* em *S. auriculata* sob estresse de Hg mostrou os efeitos sobre o desenvolvimento vegetal, o aparato fotossintético e a resposta antioxidant. Nas concentrações de Hg 7,15 e 30 mg/L foi observado necrose e, portanto, nas análises seguintes foi usada a concentração 0,7 mg/L.
- Foi verificado que BF, BS e TC tiveram aumento nos tratamentos que foram inoculados em comparação aos não inoculados, mesmo na presença do agente estressante.
- Os pigmentos fotossintéticos clorofila a e b e carotenoides aumentaram nos tratamentos inoculados, esses dados estão relacionados com a defesa antioxidant.
- Os dados de EE, corroboram a hipótese de que a levedura age produzindo moléculas de defesa, que ajudam a planta a compensar os danos causados pelo estresse com Hg.
- A aplicação de *Y. lipolytica* UENF.F em *S. auriculata* foi capaz de promover o crescimento vegetal e proteger a planta do estresse causado pelo metal tóxico.
- Considerando que a concentração de Hg utilizada nos ensaios foi muito acima do permitido pelo CONAMA, isto sugere que a interação tem potencial para ser aplicada como uma alternativa em processos de biorremediação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, Ahmad M. et al. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic engineering**, v. 50, p. 192-208, 2018.

ARANTES, Fábio P. et al. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 137-147, 2016.

AZEVEDO, L. S. et al. Drought promotes increases in total mercury and methylmercury concentrations in fish from the lower Paraíba do Sul river, southeastern Brazil. **Chemosphere**, v. 202, p. 483-490, 2018.

AYALA-LUNA, Melanie; PERNÍA, Beatriz; CORNEJO, Xavier. Determinación de la capacidad de remoción de cadmio por *Salvinia auriculata* Aubl. en agua contaminada. **Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales**, Guayaquil, v. 13, n. 2, p. 73-83, 2019.

BANKAR, Ashok V.; KUMAR, Ameeta R.; ZINJARDE, Smita S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Puni, v. 84, n. 5, p. 847-865, 2009.

BANKAR, Ashok et al. Morphological response of *Yarrowia lipolytica* under stress of heavy metals. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 559-566, 2018.

BARROSO, L.M. **Interação de planta aquática e microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2018.

BIZZO, Andresa Lana Thomé et al. Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 26, n. 3, p. 268-277, 2014.

BRAUN, Adeli Beatriz et al. Biorremediation as an alternative for the treatment of soils contaminated with toxic metals. **Revista CIATEC-UPF**, v. 11, n. 2, p. 73-87, 2019.

BRIX, Hans; SCHIERUP, H.-H. The use of aquatic macrophytes in water-pollution control. **Ambio**, v. 28, n. 2, p. 100-107, 1989.

BRUZZI, Sandra Cristina Fraga et al. Potencial fitorremediador da *Salvinia* sp. na remoção de chumbo em efluente sintético.

CAMPÓ, Walter Javier Cuadrado et al. Potencial de fitoabsorção de metais por Hydrocotyle ranunculoides para a mitigação de poluição de água nas áreas úmidas altas andinas do Peru. **Revista Ambiente & Água**, v. 15, n. 5, 2020.

CASAGRANDE, Gabriela Cristina Rabello; REIS, Cláudia dos; ARRUDA, Rafael; ANDRADE, Ricardo Lopes Tortorela de & BATTIROLA, Leandro Dênis. Bioaccumulation and Biosorption of Mercury by *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). **Water, Air, & Soil Pollution**, Netherlands, v. 229(5), p. 1-14, 2018.

COELHO, Flávia Freitas; LOPES, Frederico Santos; SPERBER, Carlos Frankl. Persistence strategy of *Salvinia auriculata* Aublet in temporary ponds of Southern Pantanal, Brazil. **Aquatic Botany**, v. 81, n. 4, p. 343-352, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Resolução nº 357/05. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. **Diário Oficial da União**, n. 53, 2005.

COGO, A.J.D. et al. Spermine modulates fungal morphogenesis and 49 activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. **Biology Open**, p. bio. 029660, 2018.

CONZA, Adelaida Otazu. **Modelagem matemática do espalhamento do poluente mercúrio na água**. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de matemática e estatística, Porto Alegre, p. 7, 2017.

CUNNINGHAM, S. D.; OW, D. W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p. 715–719, 1996.

DARVISHI, Farshad et al. *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 87-96, 2017.

DAS, S.; DASH, H.R.; CHAKRABORTY, J. Genetic basis, and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.7, p.2967-2984, 2016.

DIXIT, R. et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability**, v. 7, p. 2189-2212, 2015.

ELBAZ, A., WEI, YY, MENG, Q. et ai. Estresse oxidativo induzido por mercúrio e impacto nas enzimas antioxidantes em *Chlamydomonas reinhardtii*. **Ecotoxicologia**, EUA, 19, p. 1285-1293, 2010.

FARDIN, Paloma Batista Almeida. **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de SHRs pré-hipertensos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Ciências Fisiológicas, Vitória-ES, p. 17-27, 2019.

FREITAS, F. et al. Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 133-139, 2018.

FREITAS, Moara Cardoso. **Avaliação da resistência a mercúrio *Yarrowia lipolytica* UENF-F, uma levedura modelo para estudos com metais**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, p. 67, 2022.

FRIAS, Amanda Rosa Rodrigues de; SANTOS, Eidy de Oliveira. Commercial Technologies for Biorremediation of water bodies. **Episteme Transversalis**, v. 11, n. 3, 2020

GADD, G. M. et al. Microbial control of heavy metal pollution. Microbial control of pollution. **Microbial control of pollution**. Cambridge, p. 59-88, 1992.

GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GOMES, Antônio Márcio S. et al. Determination of Cu, Mn and V adsorption capacity in dry macrophyte biomass. **International Nuclear Atlantic Conference – INAC**, Santos, p. 21-25, 2019.

GOMES, Silvânia M. de S. et al. Cloroplast pigments as indicators of lead stress. **Associação Brasileira de Engenharia Agrícola**, Jaboticabal – SP. v. 34, p. 877-884, 2014.

GOUVEIA, Nelson et al. Exposição ocupacional ao mercúrio em cooperativas de triagem de materiais recicláveis da região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 1517-1526, 2019.

GUEDES, H. A. S. et al. Aplicação da análise estatística multivariada no estudo da qualidade da água do Rio Pomba, MG. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, p. 558-563, 2012.

GUZMÁN, Daniela Baptista Messias. **Estudo da exposição ambiental ao mercúrio utilizando biomarcadores: uma contribuição para o estabelecimento de valores de referência em conscritos do Exército Brasileiro residentes no município do Rio de Janeiro-RJ**. 2020. Tese de Doutorado.

HA, Eunhee et al. Current progress on understanding the impact of mercury on human health. **Environmental research**, v. 152, p. 419-433, 2017.

JÄRUP, Lars. Hazards of heavy metal contamination. **British medical bulletin**, v. 68, n. 1, p. 167-182, 2003.

KEHRIG, Helena A. et al. Mercury and selenium biomagnification in a Brazilian coastal food web using nitrogen stable isotope analysis: a case study in an area under the influence of the Paraiba do Sul River plume. **Marine Pollution Bulletin**, v. 75, n. 1-2, p. 283-290, 2013.

KHALID, S. et al. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247–268, 2017.

KITAHARA, Sandra Emi et al. Total mercury in fresh-water fish. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 267-273, 2000.

KOLHE, Nilesh et al. A comprehensive assessment of *Yarrowia lipolytica* and its interactions with metals: Current updates and future prospective. **Biotechnology Advances**, p. 107967, 2022.

LANGARO, Ana Claudia et al. Alterações fisiológicas na cultura do tomateiro devido à deriva simulada de herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 40-46, 2014.

LARROUDÉ, Macarena et al. Ferramentas de biologia sintética para engenharia de *Yarrowia lipolytica*. **Avanços da biotecnologia**, v. 36, n. 8, pág. 2150-2164, 2018.

LI, Fay-Wei et al. Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. **Nature plants**, v. 4, n. 7, p. 460-472, 2018.

LIMA, Adriano Cosme Pereira; FRANÇA, Flavio; JESUS, Taíse Bomfim de. Avaliação dos níveis de metais pesados no pantanal dos Marimbuses, Bahia, Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 3, p. 591-598, 2018.

LIMMER, M.; BURKEN, J. Phytovolatilization of Organic Contaminants. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 13, p. 6632-6643, 2016.

LI, YanBin; CAI, Yong. Progress in the study of mercury methylation and demethylation in aquatic environments. **Chinese Science Bulletin**, v. 58, n. 2, p. 177-185, 2013

MAHAR, A. et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 111-121, 2016.

MALLMANN, Viviane et al. As Vantagens da Biorremediação na Qualidade Ambiental. **Ensaio e Ciência**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MENDES-SILVAA, Tayane de Cássia Dias; BARBOSAA, Naiara Priscila Silva Reis; VIDALA, Esteban Espinosa. Journal of Environmental Analysis and Progress. **Journal of Environmental Analysis and Progress V**, v. 3, n. 01, p. 092-099, 2018.

MEIRELLES, Gustavo Borges; PEREZ, Karla Joseane; DE LARA, Daniela Mueller. Conceitos e aplicações entre plantas e microrganismos na remediação de hidrocarbonetos. **Revista Estudo & Debate**, Lajeado. v. 29, n. 2, p. 149-159, 2022.

MOREIRA, Icaro Thiago Andrade; MARQUES, Isadora Machado. Biorremediação de áreas costeiras impactadas por petróleo. **Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, v. 18, 2020.

MORGANO, Marcelo A. et al. Mercury levels in freshwater fishes from piscicultures established in São Paulo state. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 250-253, 2005.

NEGRÃO, Glauco Nonose; SOUZA, Nathan Ulian; BUTIK, Mariane. Avaliação do Potencial Fitorremediador da Macrófita Aquática *Salvinia Auriculata* na Absorção e Acúmulo de Zinco. **Geografia**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 367-385, 2021.

OLIVEIRA, Juraci Alves de et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de *Salvinia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras. v. 13, p. 329-341, 2001.

OROZIMBO, Karla Barreto da Silva. **Bactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas da planta aquática *Salvinia auriculata* com resistência a chumbo**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, p. 62, 2020.

OYETIBO, Ganiyu Oladunjoye et al. Mercury bioremoval by *Yarrowia* strains isolated from sediments of mercury-polluted estuarine water. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3651-3657, 2015.

PATRA, M. Sharma, A. Mercury toxicity in plants. **The Botanical Review**, New York, v. 66, n. 3, pág. 379-422, 2000.

Pernambuco: synthesis of lipids to produce biodiesel from the crude glycerol residue. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 3, n. 01, p. 092-099, 2018.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 15–39, 2005.

PRATUSH, Amit; KUMAR, Ajay; HU, Zhong. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. **International Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 97-106, 2018.

REZANIA, S. et al. Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 587- 23 599, 2016.

RODRIGUES, Ana Carolina D. et al. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: Possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.

SANTOS, Nathália Bandeira Carvalho dos. **O efeito da qualidade da água do Rio Capibaribe na estrutura anatômica, teor de pigmentos fotossintéticos e perfil de n-alcanos cuticulares de *Salvinia auriculata* Aubl.(Salviniaceae)**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SCHWANTES, Daniel et al. *Salvinia auriculata* in post-treatment of dairy industry wastewater. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 13, p. 1368-1374, 2019.

SHU, Tao et al. The pH-Responsive Transcription Factors YIRim101 and Mhy1 Regulate Alkaline pH-Induced Filamentation in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Msphere**, v. 6, n. 3, p. e00179-21, 2021.

SILVA, Helen Tais da Rosa. **A exposição ao metilmercúrio e palmitato de retinol desencadeia distúrbios hepáticos e neurobiológicos em diferentes estágios de desenvolvimento de ratos Wistar**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.107, 2020.

SILVA, Jussara Tamires de Souza. **Promoção do crescimento de *Salvinia auriculata* Aublet mediada por *Enterobacter sp.* sob estresse por cobre**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, p. 61, 2019.

SILVA, Régia Simony Braz Da et al. Avaliação sazonal da qualidade das águas superficiais e subterrâneas na área de influência do Lixão de Salinópolis, PA. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n. 2, 2018.

SOARES, I. A. et al. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 341-350, 2020.

SOUSA, W.P. (2000). **Determinação de Mercúrio e Carbono Orgânico em Solos e Sedimentos da Região Norte do Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de

Mestrado. 52 Universidade Estadual do Norte Fluminense. Centro de Biociências e Biotecnologia. 75p.

SOUZA, Carina Castro et al. Avaliação antimicrobiana de fungos isolados de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (saracura mirá). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22723-22739, 2021.

SOUZA, Julia Nascimento; CASTILHOS, Zuleica Carmen. Metilação do mercúrio e desmetilação do metilmercúrio em ambientes aquáticos. **XXII – Jornada de Iniciação Científica-CETEM**, p.1-4, 2014.

SOUZA, Sami. **Esquema representando os diferentes processos de fitoremedação.** Fundação CECIERJ. Disponível em:<<https://canal.cecierj.edu.br/recurso/9470>> acesso em 17 de julho de 2021.

SPAGNUOLO, Michael et al. Alternative Substrate Metabolism in *Yarrowia lipolytica*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1077, 2018.

SRIVASTAVA, Jatin K. et al. Plant-microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: a review. **Applied Water Science**, v. 7, n. 3, p. 1079-1090, 2017.

STREIT, Nivia Maria et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 35, p. 748-755, 2005.

TRINDADE, Claudio Rossano Trindade et al. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do Campus Carreiros-FURG. **Cadernos de Ecologia Aquática**, Rio Grande, RS. 2010

UNEP (2018). United Nations Environment Programme. Global Mercury missions by country and sector. Disponível em: <<https://public.tableau.com/views/GlobalMercuryEmissions/Dashboard1?:showVizHome=no>> Acesso em 14 de junho de 2021.

USEPA (2015), Environmental Protection Agency. Regulated drinking water contaminants. Disponível em: 14 <<http://www.epa.gov/dwstandardsregulations#Disinfectants>>. Acesso em: 16 de outubro de 2020.

VELÁSQUEZ-RIAÑO, M.; BENAVIDES-OTAYA, H.D. Bioremediation techniques applied to aqueous media contaminated with mercury. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1124-1130, 2015.

WANG, Hongying et al. Genetical Surface Display of Silicatein on *Yarrowia lipolytica* Confers Living and Renewable Biosilica-Yeast Hybrid Materials. **ACS ômega**, v. 5, n. 13, p. 7555-7566, 2020.

WANG, Jinpeng et al. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, p. 123707, 2020

WIERZBA, S. Biosorption of nickel (II) and zinc (II) from aqueous solutions by the biomass of yeast *Yarrowia lipolytica*. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2017. 28

WINDMÖLLER, C.C. et al. The redox processes in Hg-contaminated soils from Descoberto (Minas Gerais, Brazil): Implications for the mercury cycle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 201-211, 2015.

WOLFF, Graziele et al. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 133-137, 2009.

ZINJARDE, Smita et al. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: interactions and applications. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 5, p. 920-933, 2014.

9. APÊNDICE

Tabela 4. Dados brutos da curva de crescimento da levedura.

Curva de fermentação do inóculo										
Hora do Dia	Tempo (h)	DO meio	Diluição	Repetição 1	Total	Repetição 2	Total	Repetição 3	Total	Média
16:40	0	0,044	2	0,250	0,50	0,325	0,65	0,3	0,60	0,58
18:40	2	0,044	10	0,345	3,45	0,415	4,15	0,396	3,96	3,85
20:40	4	0,044	10	0,281	2,81	0,341	3,41	0,398	3,98	3,40
22:40	6	0,044	10	0,421	4,21	0,253	2,53	0,408	4,08	3,61
12:40	8	0,044	20	0,221	4,42	0,354	7,08	0,253	5,06	5,52
02:40	10	0,044	20	0,347	6,94	0,391	7,82	0,352	7,04	7,27
04:40	12	0,044	20	0,389	7,78	0,381	7,62	0,372	7,44	7,61
06:40	14	0,044	50	0,301	15,05	0,183	9,15	0,207	10,35	11,52
08:40	16	0,044	50	0,318	15,90	0,332	16,60	0,311	15,55	16,02
10:40	18	0,044	100	0,383	38,30	0,209	20,90	0,207	20,70	26,63
12:40	20	0,044	100	0,298	29,80	0,297	29,70	0,263	26,30	28,60
14:40	22	0,044	100	0,271	27,10	0,291	29,10	0,364	36,40	30,87
16:40	24	0,052	100	0,284	28,40	0,318	31,80	0,283	28,30	29,50
18:40	26	0,049	100	0,199	19,90	0,279	27,90	0,313	31,30	26,37

Tabela 5. Dados brutos das análises de planta.

Tratamento	Repetição	Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)	Taxa de crescimento (%)	Clorofila a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Clorofila b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Extravasamento de eletrólitos (%)
Planta (Controle)	1	8,345	0,290	95,41	466,88	211,320	162,915	6,396
Planta (Controle)	2	8,129	0,291	92,94	390,00	208,000	190,000	6,606
Planta (Controle)	3	8,122	0,312	92,86	439,66	302,261	141,355	6,000
Planta (Controle)	4	7,931	0,320	90,67	355,72	311,140	109,977	6,791
Planta (Controle)	5	8,500	0,318	97,18	614,88	155,677	172,099	6,423
Planta (Controle)	6	8,900	0,334	101,75	471,34	234,003	90,460	5,571
Planta + Levedura	1	11,490	0,390	131,36	778,57	418,893	278,451	6,000
Planta + Levedura	2	13,900	0,399	158,92	797,83	461,332	241,970	5,875
Planta + Levedura	3	12,120	0,401	138,57	706,40	290,779	273,467	6,408
Planta + Levedura	4	12,200	0,407	139,48	872,71	213,174	198,528	5,652
Planta + Levedura	5	12,400	0,391	141,77	712,30	448,261	186,570	6,763
Planta + Levedura	6	11,700	0,379	133,76	660,18	386,767	264,309	6,906
Planta + Metal + Levedura	1	10,540	0,320	120,50	451,47	210,887	145,439	7,933
Planta + Metal + Levedura	2	10,111	0,312	115,60	386,92	235,530	119,400	7,610
Planta + Metal + Levedura	3	9,974	0,392	114,03	496,56	222,996	167,393	7,597
Planta + Metal + Levedura	4	10,350	0,399	118,33	446,53	239,114	166,705	7,651
Planta + Metal + Levedura	5	9,800	0,389	112,04	472,07	321,712	163,612	7,450
Planta + Metal + Levedura	6	9,144	0,375	104,54	436,03	420,642	172,617	8,298
Planta + Metal	1	6,128	0,211	70,06	278,44	34,720	59,023	13,188
Planta + Metal	2	6,500	0,230	74,31	206,37	96,705	17,955	15,500
Planta + Metal	3	6,490	0,240	74,20	204,62	57,815	34,944	14,833
Planta + Metal	4	6,128	0,244	70,06	349,26	30,326	118,393	15,902
Planta + Metal	5	6,901	0,239	78,90	371,75	27,142	62,771	13,729
Planta + Metal	6	6,890	0,311	78,77	202,87	48,024	84,761	21,818

Tabela 6. Estatísticas das análises de planta. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Tratamentos	Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)	Taxa de crescimento (%)	Clorofila a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Clorofila b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Extravasamento de eletrólitos (%)
Planta (Controle)	8,32 c	0,31 b	95,1 c	456,4 b	237 b	144,4 b	6,2 b
Planta + Levedura	12,30 a	0,39 a	140,6 a	754,6 a	369,8 a	240,5 a	6,2 b
Planta + Metal + Levedura	9,98 b	0,36 a	114,1 b	448,2 b	275,1 ab	155,8 b	7,7 b
Planta + Metal	6,50 c	0,24 c	74,3 d	268,8 c	49,1 c	62,9 c	15,8 a