UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

TIAGO TOGNOLLI DE ALMEIDA

Potencial biorremediador do fungo endofítico *Mucor* sp. isolado da macrófita aquática *Eichornia crassipes* (Mart)

Piracicaba 2018

TIAGO TOGNOLLI DE ALMEIDA

Potencial biorremediador do fungo endofítico *Mucor* sp. isolado da macrófita aquática *Eichornia crassipes* (Mart)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Piracicaba 2018 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Almeida, Tiago Tognolli de

Potencial biorremediador do fungo endofítico *Mucor* sp. isolado da macrófita aquática *Eichornia crassipes* (Mart) / Tiago Tognolli de Almeida; orientador João Lúcio de Azevedo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

86 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Biorremediação 2. Biotecnologia 3. Cádmio 4. Fungos endofíticos 5. Metais pesados I. Título.

CDU 606:628

Dedico este trabalho a Deus por toda força e inspiração, a minha esposa Fernanda e ao nosso filho (a) que está a caminho, por todo apoio e compreenção e aos meus pais Mario e Maria pelo carinho e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial, gostaria de agradecer algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo;

Em especial a Deus por toda a força, sem ele eu não conseguiria chegar até aqui;

Ao meu Orientador Dr. João Lúcio de Azevedo, por todo apoio, paciência e por ser exemplo de pesquisador e humildade para mim;

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro;

Ao programa de Pós-Graduação do CENA;

A Professora Dra. Maria Carolina Quecine pelo suporte e parceria.

Ao Professor Dr.Wellington Araújo, a quem sou muito grato, por ter me acolhido em seu Laboratório, por me ajudar e ser um grande amigo;

Ao Professor Dr. João Alencar Pamphile, pela ajuda desde o início na elaboração do projeto para o processo seletivo e grande incentivo no decorrer do trabalho;

Professor Dr. Ricardo Azevedo, Dr. Tiago Tezotto, Dra. Salete Gaziola, Professor Dr. Fernando Piotto, Mônica, Berenice, Karina, Professor Dr. Elliott Watanabe Kitajima, Renato Salaroli, Natália, pelo trabalho em parceria e por terem me ajudado diretamente em meus experimentos;

Aos meus amigos do Laboratório GENMICRO, Maria Carolina que me ajudou desde a chegada em Pira, Bruno meu grande amigo que sempre me ajudou nos experimentos, Zézo sempre me socorreu, Bia por ter me ensinado a transformação, Bruna que assim como o Bruno me ajudou em várias coisas, Renata, Jaque, Joelma, Jéssica, Mari, Helena, Gustavo (Maculosa), Isa, Renatinha, Carolzinha, Paula, Daniel, Everthon (tô operado), Giulio, Bruna Pacheco, CC, Inês; Julia; Aos meus amigos do LABMEM, vocês que me aguentaram todos os dias cantando e ensinando as músicas do Raça Negra para o pessoal da Colômbia. Luiz Ricardo (Luri) que me ajudou em muita coisa, assim como a Manu, minha FRIEND Sasá, Pri, Leandro Garrido (Lele), Lina, Jennifer que aguentaram minhas reclamações, Lili, Almir, Felipe, Carol, Dai (Fai), Emi, Ju, Nádia, Aleja, Jana, Karent, Laura, Alexis, professor Dr. Gabriel Padilla;

Aos meus "Titios" da República Central do Brasil, André, Paraíba, Genésio, Lenart, Thiago (boladinho), Max, Henrique, Gustavo, Diego, Alex, Jhon (cabronzito), Edinaldo, Linker, pelos momentos de descontração e parceria!

Aos amigos do grupo Aliança viva, por terem me acolhido em São Paulo;

Aos amigos do grupo Renascer de Maringá pelo incentivo desde o início;

A minha família, minha mãe Cida, meu pai Mario, minha irmã Angela e seu marido Dercio e meu sobrinho Gustavo, pelas orações e carinho;

A minha esposa Fernanda e sua família, por sempre acreditar em mim, seus exemplos de força e dedicação me fizeram acreditar que eu poderia ir mais longe.

A todos o meu muito obrigado!

" Até aqui nos ajudou o Senhor". 1 Samuel 7:12

.

RESUMO

ALMEIDA, T. T. Potencial biorremediador do fungo endofítico *Mucor* sp. isolado da macrófita aquática *Eichornia crassipes* (Mart). 2018. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior de tecidos ou órgãos dos vegetais, sem causar danos aos seus hospedeiros. Dentre as inúmeras características desses microrganismos está o seu potencial biorremediador Este trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial biorremediador do endófito Mucor sp. isolado de Eichhornia crassipes (Mart.) (Pontederiaceae), verificando a tolerância e capacidade de absorção do metal pesado cádmio (Cd), os efeitos desse metal na morfologia celular e no sistema de defesa antioxidante do fungo, e também o comportamento da planta modelo Solanum lycopersicum cultivar Calabash Rouge, inoculada com o endófito na presença do metal cádmio. Os resultados apresentados indicaram que um fungo endofítico do gênero Mucor, isolado da macrófita aquática E. crassipes, oriunda de uma lagoa contaminada com metais pesados, apresentou resistência a altas concentrações do metal cádmio. Este fungo apresentou uma modificação na sua morfologia em altas concentrações do metal, além de possuir a capacidade de reter este metal, tanto no interior do seu citoplasma, quanto em sua parede celular, o que pode estar ligada a mecanismos de desintoxicação e seguestro de metais relacionados à formação de complexos Cd-GSH. O mesmo fungo também apresentou um aumento na relação GSH/GSSG nos tratamentos com o metal. Os resultados ainda demonstraram que o estresse causado pelo metal induziu a ativação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GR no isolado endofitico. Além disso, este endófito, quando inoculado em plantas de tomate (Solanum lycopersicum), aumentou a capacidade de absorção do metal na parte aérea desta planta, além de promover crescimento da mesma, nos tratamentos sem o metal, Desta forma o isolado endofítico (CM3) Mucor sp. mostrou um potencial biorremediador, podendo ser utilizado como ferramenta para diminuir os danos causados a saúde humana e ao meio ambiente pelos metais pesados, principalmente o metal cadmio, e também na promoção de crescimento de plantas.

Palavras-chave: Biorremediação. Cádmio. EROs. Metais pesados. Microrganismos endofíticos.

ABSTRACT

ALMEIDA, T. T. **Bioremediation potential of endophytic fungi** *Mucor* **sp. isolated from** *Eichhornia crassipes* (Mart.) 2018. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Endophytic fungi live in the interior of plant tissues or organs, without causing harm to their hosts. Among several interesting characteristics of these microorganisms, some of them present a good potential for bioremediation. This study aimed at assessing the bioremediation potential of endophytic fungus *Mucor* sp. isolated from a Eichhornia crassipes (Mart.) (Pontederiaceae), analyzing chemical absorption ability and fungal tolerance to the heavy metal cadmium (Cd), besides testing the effects of cadmium on the cell morphology, the antioxidant defense system of the fungus, and the behavior of model plant (Solanum lycopersicum) variety Calabash Rouge inoculated with a spore suspension of *Mucor* sp. in the presence of cadmium. The results indicated that the endophytic fungus isolated from a *Eichhornia crassipes* (Mart.) plant located in a lagoon contaminated with heavy metals showed resistance to high concentrations of cadmium. The isolated fungus was identified as Mucor sp. The morphology studies demonstrated the occurrence of modifications on the fungus when in high concentrations of the metal. Furthermore, it was possible to verify that the fungus has a capacity to retain metal, both in the cytoplasm and cell wall. This aspect can be linked to detoxification and sequestration mechanisms of metals related to formation of Cd-GSH complexes, since this fungus also presented increase of GSH/GSSG ratio in the treatments with metal. The results also demonstrated that the stress caused by cadmium induces the activation of antioxidant enzymes SOD, CAT and GR in *Mucor* sp.. Moreover, the inoculation of this fungus in tomato plants increased the biosorption capacity of the cadmium in aerial parts of the plant, besides promoting its growth in the treatments without the metal. Thus the endophytic isolate (CM3) *Mucor* sp. presented a promising potential as a bioremediator, which can be used as a tool for reducing the damage caused by heavy metals, especially cadmium, to human health and environment.

Keywords:. Bioremediation. Cadmium. EROs. Heavy metals. Endophytic microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos compostos produzidos por endófitos isolados de
Eichhornia crassipes: austradixantona derivados de xantona (1-1a,1b);
sesquiterpeno (+) -austroseno (2); compostos já conhecidos (3 a 7), derivados
de difenil esteres (8 a 11)23
Figura 2. Redução da glutationa oxidada (GSSG) para a glutationa reduzida (GSH),
por meio da enzima Glutationa Redutase32
Figura 3. Estrutura química da Glutationa (GSH)
Figura 4. Modelo de complexo entre o íon Cd (II) e uma molécula de fitoquelatina.
Cys (cisteína), Glu (ácido glutâmico), Gly (glicina) e S (enxofre)
Figura 5. A) E. Crassipes coletada na Lagoa Salto Grande - Americana SP. B, C)
Fungos endofíticos isolados de E. Crassipes provenientes da Lagoa Salto
Grande – Americana SP. D) Água do último enxague das folhas como controle
de desinfecção46
Figura 6. Árvore filogenética construída com seguências de aproximadamento
500bp. dos isolados endofíticos de <i>E. crassipes</i> e següências de distância para
nucleotídeos, com a opcão de exclusão de vazio pairwise. Os números acima e
abaixo de cada nó indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação
nas análises de bootstran de 1000 repetições
Figura 7 Índice de tolerância dos isolados endofíticos (It) nas concentrações 0.250
$500, 1000, 2000 \text{ and } 4000 \text{ mg/L} \text{ de CdCl}_2 (I - \text{harra de erro})$
Figure 8 Absorção ($a = (mg / g) de Cd pelo do isolado endofítico CM3 (Mucor sp.)$
rigura o. Absolção (q = (mg / g) de cu pelo do isolado endomico civis ($\frac{10000}{1000}$ sp.)
en meio líquido contendo as concentrações 0, 200, 400, 600, 600 e 1000 (mg /
L) de CdCl ₂ , apos 3, 9 e 15 días (I = barra de erro). (B) Crescimento em (g) do isolado en defítico OMO (Alvenner,) foresta o diferentes concentraçãos e noríados
isolado endotítico CIVI3 (<i>Mucor</i> sp.) frente a diferentes concentrações e periodos
de incubação. Letras minusculas, diferentes, no topo das colunas indicam que
os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott50
Figura 9. (A) Caracterização das isoenzimas da SOD ,(B) Gel de atividade da
enzima SOD, onde (P) corresponde ao padrão de peso molecular, (1, 2 e 3)
correspondem as concentrações (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de loreto de
cádmio (CdCl2) respectivamente.Os números romanos (I e II) correspondem às
isoformas de SOD, MnSOD e FeSOD, respectivamente
Figura 10. Efeito das dosagens de (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de cádmio na
atividade de SOD no micélio do isolado endofítico (CM3) Mucor sp. nos períodos
de tempo 3, 9 e 15 dias, avaliado por espectrofotometria. Diferentes letras
maiúsculas e minúsculas em cima das colunas indicam que em 3, 9 e 15 dias de
exposição ao CdCl ₂ , os valores são diferentes em p <0.05, pelo teste de Scott-
Knott
Figura 11 Gel de atividade da enzima CAT onde (P) corresponde ao padrão de
peso molecular (1, 2, e, 3) correspondem as concentrações (0 Controle, 200 e
400 mg/l) de cloreto de cádmio (CdCl ₂) respectivamente. Os púmeros romanos
(1 $\lambda = \lambda$) corresponden às isoformas da CAT
$(i, ii, iii, iv \in v)$ conceptingent as isolonnias da OAT

- Figura 15. Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), (A) Controle sem CdCl₂ (B) 200 mg/L de CdCl₂, e (C) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, no período de 3 dias de tratamento, (D) Controle sem CdCl₂ (E) 200 mg/L de CdCl₂, e (F) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, no período de 9 dias de tratamento, (G) Controle sem CdCl₂ (H) 200 mg/L de CdCl₂, e (I) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (I) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, e (S) na presença de 400 mg/L

- Figura 20. Plantas de tomate (Solanum lycopersicum) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com

30 μM CdCl2. (A) - *Mucor* sp.-Cd; (B) - *Mucor* sp. + Cd; + *Mucor* sp -Cd (D) + *Mucor* sp + Cd61

- Figura 21. Circunferência do caule de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 µM CdCl₂. Diferentes letras em cima das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott....62

- Figura 24. Raizes de Solanum lycopersicum cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 μM CdCl₂. (A) raiz lateral (B) raiz axial. Diferentes letras em cima das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott....64</p>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos xenobiontes remediados pelos fungos do gênero Mucor27
Tabela 2. Compostos degradados ou imobilizado por microrganismos
Tabela 3. Isolados endófiticos de E.crassipes, identificados em relação ao gênero
ou espécie e a percentagem de identidade encontrada no site NCBI (National
Center for Biotechnology Information) website47
Tabela 4. Crescimento do isolado endofítico CM3 e absorção de Cd em meio
contendo diferentes concentrações após 3, 9 e 15 dias. Os valores são médias e
± são os desvios padrão das triplicadas51
Tabela 5. Quantificação do metal Cd em tomate (Solanum lycopersicum) cultivar
Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após
o tratamento com 30 μM CdCl₂64
Tabela 6.Frequencia de colonização do reisolamento do endófito Mucor sp., dos
órgãos da planta modelo de tomate (Solanum lycopersicum) cultivar Calabash
Rouge. (40 fragmentos utilizados)65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Macrófita aquáticas Eichhornia crassipes (Mart)	22
2.2 Fungos endofíticos	24
2.3 Interação Endofito-planta e a sua relação com a fitorremediação	25
2.4 Fungos do gênero Mucor	26
2.5 Poluição causada por metais pesados	27
2.6 Biorremediação realizada por microrganismos	28
2.7 Biorremediação de metais pesados	29
2.8 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	30
2.9 Enzimas Antioxidantes	31
2.9.1 Enzima Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	31
2.9.2 Enzima Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	31
2.9.3 Enzima Glutationa redutase (GR EC 1.6.4.2)	32
2.10 Tripeptídio GSH	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Isolamento	35
3.2 Identificação molecular	36
3.3 Indice de tolerância	37
3.4 . Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd	37
3.5 Atividades das enzimas do sistema antioxidante	38
3.5.1 Extração de proteínas totais	38
3.5.2 Gel SDS-PAGE- (10% poliacrilamida)	39
3.5.3 Atividade da enzima Superóxido Dismutase – SOD em PAGE não despaturante	39
3 5 4 Atividade da enzima Superóxido Dismutase – SOD em espectrofotômetro	40
3 5 5 Atividade da enzima Catalase – CAT em PAGE não despaturante	40
35.6 Atividade da enzima Catalase – CAT em espectrofotômetro	40
3.5.7 Atividade da enzima Glutationa Redutase – GR	. +0
3.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG	Δ1
3.7 Microsconia eletrônica e microanálise de Raio-X (EDS/EDX)	⊿1
	1

3.7.2 Análises de Amostras em microscopia eletrônica de transmissão 42 3.7.3 Microanálise de Raio-X (EDS/EDX) 43 3.8.1 Interação planta fungo 43 3.8.1 Produção de AIA 43 3.8.2 Ensaio de hidropônia 43 3.8.3 Medição de biomassa 44 3.8.4 Análises das raízes 44 3.8.5 Acumulo de Cd na planta 45 3.8.6 Reisolamento 45 3.8.7 RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4 Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de <i>Mucor</i> sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
3.7.3 Microanálise de Raio-X (EDS/EDX)
3.8. Interação planta fungo 43 3.8.1 Produção de AIA 43 3.8.2 Ensaio de hidropônia 43 3.8.3 Medição de biomassa 44 3.8.3 Medição de biomassa 44 3.8.4 Análises das raízes 44 3.8.5 Acumulo de Cd na planta 45 3.8.6 Reisolamento 45 3.9 Análise estatística 45 4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4 Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de <i>Mucor</i> sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
3.8.1 Produção de AIA
3.8.2 Ensaio de hidropônia 43 3.8.3 Medição de biomassa 44 3.8.3 Medição de biomassa 44 3.8.4 Análises das raízes 44 3.8.5 Acumulo de Cd na planta 45 3.8.6 Reisolamento 45 3.9 Análise estatística 45 4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4 Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de <i>Mucor</i> sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
3.8.3 Medição de biomassa 44 3.8.4 Análises das raízes 44 3.8.5 Acumulo de Cd na planta 45 3.8.6 Reisolamento 45 3.9 Análise estatística 45 4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4 Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de <i>Mucor</i> sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
3.8.4 Análises das raízes 44 3.8.5 Acumulo de Cd na planta 45 3.8.6 Reisolamento 45 3.9 Análise estatística 45 4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de Mucor sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
3.8.5 Acumulo de Cd na planta
3.8.6 Reisolamento 45 3.9 Análise estatística 45 4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de Mucor sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
3.9 Análise estatística 45 4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de Mucor sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
4. RESULTADOS 46 4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de Mucor sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
4.1 Isolamento 46 4.2 Identificação 47 4.3 Resistência ao metal Cd 49 4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd 49 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de <i>Mucor</i> sp. 51 4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG 55
4.2 Identificação
 4.3 Resistência ao metal Cd
 4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd
 4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de <i>Mucor</i> sp
1.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG55
4.7 Microscopia eletrônica 56
4.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)56
1.7.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 57
1.7.3 Microanálise de Raio-X (EDS/EDX)58
1.8 . Interação planta fungo 60
1.8.1 Produção de AIA 60
1.8.2 Ensaio de hidropônia 60
4.8.3. Quantificação do metal Cd nas plantas de tomate <i>(Solanum lycopersicum</i> cultivar Calabash Rouge)
4.8.4 Reisolamento
5. DISCUSSÃO
6 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos ou simplesmente endófitos são principalmente fungos ou bactérias que colonizam o interior de tecidos ou órgãos vegetais das plantas podendo ser, entre outros, folhas, caule ou raiz. Colonizam essa planta em todo o seu período de vida ou apenas parte do seu ciclo, sem causar danos nas plantas (AZEVEDO et al., 2002).

A colonização endofítica pode ser intracelular e limitada a uma única célula, intercelular e localizada, intra e intercelular sistêmica (STONE et al., 2000). A disseminação dos fungos para as diversas partes da planta ocorre de maneira sistêmica, habitando de forma ativa o apoplasto e os vasos condutores (HALLMANN et al., 1997). Os mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, tais como pólen, ovários, anteras e estames, podem ser colonizados. Contudo, os microrganismos endofíticos apresentam diferentes preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam (ARAÚJO et al., 2010).

Esses microrganismos são de grande interesse biotecnológico, pois apresentam propriedades aplicadas a diferentes áreas, e são potencialmente úteis na agricultura. Estudos indicam que a presença desses endófiitos podem reduzir em grande número o ataque de insetos e fungos patogênicos à planta hospedeira (AZEVEDO et al., 2002), são também utilizados como vetores para a transformação genética em plantas (PAMPHILE, 1997; PAMPHILE et al., 2004), e na produção de enzimas extracelulares (CUZZI et al., 2011; BERNARDI-WENZEL, 2013). Na indústria farmacêutica podem atuar na produção de antibióticos, metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos, produção de fitohormônios (WEBER et al., 2006; PILEGGI et al., 2002; ORLANDELLI et al., 2012, WAQAS et al., 2015), substâncias com atividades antitumorais (NETO et al., 2002), e também podem atuar como agentes biorremediadores, modificando o sistema antioxidante da planta hospedeira (LUO et al., 2011; XU, R et al., 2015; XU, X et al., 2015, MOHD et al., 2017), e

Este trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial biorremediador do endófito *Mucor* sp. isolado de *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae), verificando a tolerância e capacidade de absorção do metal pesado cádmio (Cd), os efeitos desse metal na morfologia celular e no sistema de defesa antioxidante do

fungo, e também o comportamento da planta modelo *Solanum lycopersicum* cultivar Calabash Rouge inoculada com o endófito na presença do metal Cd

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Macrófita aquáticas Eichhornia crassipes (Mart)

Macrófitas aquáticas são vegetais que durante o seu processo evolutivo retornaram ao ambiente aquático, e desta forma apresentam várias estruturas encontradas em vegetais terrestres, que não são funcionais na maioria das espécies de macrófitas aquáticas. Elas podem ser divididas simplificadamente em duas classes, as flutuantes ou submersas e classificadas como: emersas, com folhas flutuantes, submersas enraizadas, submersas livres e aquáticas flutuantes (ESTEVES, 1998).

Eichornia crassipes é uma macrófita nativa do Brasil, provavelmente da região amazônica, porém é grandemente distribuída no norte e nordeste do Brasil, abrangendo também uma parte da Venezuela e parte da América Central e das ilhas maiores do Caribe (BEYRUTH, 1992). Esta é uma espécie flutuante que possui uma grande importância ecológica demonstrada por intermédio de suas propriedades filtradoras. Estudos têm demonstrado a sua eficiência na diminuição de metais pesados de efluentes industriais, e também na remoção de *Escherichia coli,* de efluentes gerados pelo cultivo de camarões (OLIVERO; SOLANO, 1998; TRIPATHI, 2011; OLIVEIRA, 2013; MODENES et al., 2013).

Além de apresentar um potencial biorremediador, esta macrófita vem chamando a atenção em relação a sua comunidade endofítica. Almeida et al. (2015) isolaram de *E. crassipes e E azurea*, nativas da planície de inundação do Rio Paraná, e identificaram, por meio da região ITS1-5.8S-ITS2, 21 fungos endofíticos dos gêneros *Alternaria, Bipolaris, Cercospora, Diaporthe, Gibberella, Pestalotiopsis, Plectosphaerella, Phoma, e Saccharicola*, indicando a colonização por diversos gêneros desses organismos de potencial biotecnológico.

Ebrahim et al. (2016) utilizando o fungo endofítico *Aspergillus austroafricanus*, também isolado de *E. crassipes*, em consórcio com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Streptomyces lividans*, obtiveram e identificaram 11 compostos, dentre eles dois novos compostos o austradixantona derivados de xantona (1) e o sesquiterpeno (+)-

austroseno (2), e mais nove compostos conhecidos, dentre eles derivados de Difenil esteres (Figura 1), sendo que todos demonstraram antividades antibacterianas moderadas contra *Bacillus subtilis*.

Figura 1 - Estrutura química dos compostos produzidos por endófitos isolados de *Eichhornia crassipes:* austradixantona derivados de xantona (1-1a,1b); sesquiterpeno (+) -austroseno (2); compostos já conhecidos (3 a 7), derivados de difenil esteres (8 a 11).



Fonte: Ebrahim et al. (2016)

2.2 Fungos endofíticos

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas, de modo geral, em órgãos como caules e folhas, sem causar danos ao seu hospedeiro. Estes microrganismos foram inicialmente descritos por Bary (1866), no entanto foram ignorados por mais de um século devido à carência de conhecimento sobre as suas verdadeiras funções no hospedeiro e também por falta de estruturas externas visíveis (PEIXOTO et al., 2002). Existe uma grande quantidade de endófitos que podem ser isolados de espécies simples de plantas, entretanto, somente poucos fungos são dominantes em cada hospedeiro e podem ser considerados específicos. Por não colonizarem hospedeiros em outras famílias de plantas, sua ocorrência frequentemente está limitada a somente um ou poucos hospedeiros (PETRINI, 1991).

Na maioria dos casos os fungos endofíticos apresentam uma relação mutualística, antagonista ou neutra com seu hospedeiro. Com relação ao mutualismo, o endófito pode conferir características importantes ao hospedeiro, como resistência ao estresse hídrico; alteração nas propriedades fisiológicas; produção de fitohormônios, além de compostos bioativos (AZEVEDO et al., 2000; ETESAMI, 2015).

A colonização endófito-hospedeiro pode ocorrer de maneira semelhante ao dos patógenos, por meio de infecção de sementes ou zona radicular; ou pela entrada via pecíolo, hidatódios e estômatos; ou ainda, por feridas deixadas por patógenos e insetos (SCHULZ; BOYLE, 2005; MARINHO et al., 2005; CHAPLA et al., 2013). Os microrganismos endofíticos provenientes desta via de transmissão podem vir a ser patogênicos ou saprófitos em algum momento da vida do hospedeiro, por exemplo, quando as folhas entram em senescência (SAIKKONEN et al., 1998).

A relação endófito-hospedeiro é marcada por um equilíbrio entre a produção de sinais, no caso, pelo fungo, com reconhecimento destes pela planta, desencadeando algum tipo de resposta (negativa ou positiva) (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011). Devido a isso o estudo da relação endófito hospedeiro pode resultar no estabelecimento de fontes alternativas de substâncias de interesse biotecnológico potencialmente úteis na agricultura. Estudos indicam que a presença desses endofítos pode reduzir em grande número o ataque de insetos e fungos patogênicos à planta hospedeira (AZEVEDO et al., 2002; ARAUJO et al., 2010), são também utilizados como vetores para a transformação genética em plantas (PAMPHILE et al., 2004). Na indústria farmacêutica podem atuar na produção de antibióticos, metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (GARCIA et al., 2012; ORLANDELLI et al., 2012; RHODEN et al., 2012; SANTIAGO et al., 2012; HUSSAIN et al., 2014; FERREIRA et al., 2015) e substâncias com atividades antitumorais (ASKER et al., 2013; ORLANDELLI, 2015), atividade antileshimanial (ALMEIDA et al., 2017), além de atuar como agente biorremediador na absorção de metais (DENG et al., 2011; WANG et al., 2014).

Verma et al. (2016) avaliaram a capacidade do fungo endofítico *Alternaria alternata*, isolado das folhas de *Cupressus torulosa*, localizada em Garhwal, região do Himalaia, de absorver os metais Cu ⁺², Pb ⁺², Ag ⁺, Hg ⁺². O endófito *A. alternata* foi eficiente na remoção de quantidade variável desses metais, onde mostrou maior capacidade de absorção para o metal Pb ⁺², a qual foi de 80% e a menor absorção para o metal de Ag de 63,1% a 50 µg / mL de concentração em meio de cultura, demonstrando assim a capacidade de absorção de bioacumulação de metais pelos microrganismos endofíticos.

2.3 Interação endofito-planta e a sua relação com a fitorremediação

A fitorremediação é uma estratégia na qual são utilizadas plantas para a desintoxicação e remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos, principalmente do solo (WANG et al., 2017). Esta técnica é baseada na capacidade natural das plantas para extrair componentes da água, ar e solo, e já foi usada na remediação de uma variedade de produtos incluindo metais, orgânicos, excesso de nutrientes e radionuclídeos (DENG et al., 2017).

Estas características de algumas plantas podem estar relacionadas aos microrganismos endofíticos nela presentes (FENG et al., 2017), uma vez que os mesmos apresentam uma relação mutualística com seu hospedeiro que podem conferir características importantes, como resistência ao estresse hídrico; alteração nas propriedades fisiológicas; produção de fitohormônios, e de compostos bioativos. (AZEVEDO et al., 2000). Além disso, os endófitos que possuem sistemas adequados para o sequestro, absorção e degradação de metais pesados, podem tornar a planta hospedeira tolerante a presença destes contaminantes, fazendo com

que essas plantas sobrevivam em ambientes contaminados com esses xenobiontes (ALY et al., 2011).

Mohd et al. (2017) inocularam o fungo endofítico *Piriformospora indica* em planta de *Oryza sativa* (arroz), as quais foram tratadas com o metal arsênio. Os resultados demostraram uma hiper colonização dos endófitos nas raízes da planta hospedeira, o que resultou na recuperação de biomassa. Além disso, o endófito levou ao equilíbrio o estado redox da planta e também demostrou a capacidade de imobilização do metal tornando-o insolúvel, aumentando assim a capacidade fitorremediadora da planta.

2.4 Fungos do gênero Mucor

Mucor é um gênero de fungos da ordem Mucorales, predominantemente composto de fungos formadores de zigósporos. A primeira observação de um fungo deste gênero foi feita em 1665 por Robert Hooke, e desde então várias espécies têm sido relatadas, e o interesse por este gênero vem crescendo devido ao seu potencial biotecnológico (NODET et al., 2017).

Em sua estrutura o micélio vegetativo geralmente é aseptado, a reprodução é assexuada por meio endósporos não móveis, os quais formam esporângios, esporangiósporos ou merosporangios, ou sexual pela formação de zigósporos após a fusão genital ou azigósporos sem conjugação gênica prévia (KRINGS et al., 2013).

Membros deste gênero possuem características relevantes favorecendo o seu uso na produção de biodiesel (AHMAD et al. 2017, CARVALHO et al. 2017), produção de enzimas como as lipases (BABAKI et al. 2016, GARCIA-GALAN et al. 2017, SAMADI et al 2017), amilases (SALEEM e EBRAHIM, 2014) proteases (NASCIMENTO et al. 2016), além de serem aplicados na remediação e estabilização de diversos compostos (Tabela 1).

Deng et. al. (2011), com isolados de *Brassica chinensis*, cultivadas em solo contaminado com metais, avaliaram as possíveis aplicações, destes isolados, na remoção de Cd e Pb de soluções. Os resultados mostraram que o fungo endofítico *Mucor* sp. foi potencialmente aplicável para a descontaminação de meios com os metais Cd e Pb, onde a partir de uma solução Cd de 2.0mM, a biossorção máxima capacidade de Cd por biomassa viva de *Mucor* sp. foi de 173mg/g.

Composto remediado	Organismo	Referencia
Cr	Mucor hiemalis	Tewari; Vasudevan; Guha, 2005
Benzo(a)pireno	Mucor sp.	Dan at al., 2006
Pentaclorofenol	Mucor plumbeus	Carvalho et al., 2011
Cd, Pb	Mucor sp.	Deng at al., 2011
DDT	Mucor circinelloides	Purnomo et al., 2011
hidrocarbonetos de petróleo	Mucor circinelloides	Marchut-Mikolajczyk et al., 2015
Acetaminofeno	Mucor hiemalis	Esterhuizen-Londt; Schwartz; Pflugmacher, 2016
Zn, Pb	Mucor circinelloides,	Cui et al., 2017
Zn, Cr, Co, Mn e Cu	<i>Mucor</i> sp.	Zahoor et al., 2017

Tabela 1	. Compo	stos xe	enobiontes	remediados	pelos	funaos d	o aênero	Mucor
							- 3	

2.5 Poluição causada por metais

Poluição por metais pesados é uma das preocupações ambientais mais importantes, pois pode afetar diretamente a saúde de plantas e animais incluindo os seres humanos (ZHONG et al., 2012). Atividades antrópicas, como mineração e fundição de metálicos, agricultura e indústrias são responsáveis pela eliminação de metais, como Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Rd, Sn, Th, U e Zn (MALIK, 2004), os quais podem produzir efeitos nocivos à saúde humana quando absorvidos em quantidades que não podem ser processadas pelo organismo, causando danos cerebrais e renais, doenças do fígado, lesões nos ossos, câncer de pulmão, nariz e ossos, desconfortos e fraquezas, dores de cabeça, tonturas e problemas respiratórios (RAHMANI et al., 2010; REPO et al., 2011).

Dentre os metais o Cd, que ocorre naturalmente na crosta terrestre, é geralmente encontrado como impureza de zinco e chumbo, desta forma sendo proveniente da fundição desses dois outros metais. Comercialmente este metal é utilizado na fabricação de produtos eletrônicos, pilhas, cosméticos e aço galvanizado (BERNHOFT, 2013).

O Cd pode se acumular em tecidos vegetais sem demonstrar sintomas de contaminação, entrando assim na cadeia alimentar (AZZI et al., 2017; KHAN et al., 2017), com um tempo de meia vida entre 15 e 30 anos, tornando-se um problema em relação a saúde humana, que se ingerido pode afetar o sistema cardiovascular, rins e fígado, além de possuir potencial carcinogênico (JABLONSKA et al., 2017; ZHU et al., 2017; WEI; SHAIKH, 2017).

Em microrganismos principalmente nos fungos, o Cd pode influenciar diretamente no estado redox da célula, além de causar mudanças significativas na morfologia, inibição de crescimento, peroxidação lipídica e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (XU, X. et al., 2015).

2.6 Biorremediação realizada por microrganismos

Biorremediação é o processo pelo qual compostos tóxicos são degradados por microrganismos sob condições controladas, para convertê-los em produtos inofensivos ou diminuir a níveis a abaixo dos limites de concentração estabelecidos pelas autoridades reguladoras (BESTAWY et. al., 2013).

Esta técnica já é usada desde 600 aC onde os antigos romanos dirigiam águas residuais para grandes poços ou tanques fora da cidade nos quais estes produtos passavam por um tratamento com microrganismos (KHOEI et al. 2013). Atualmente esta técnica vem sendo estudada na transformação ou imobilização de vários compostos xenobiontes (Tabela 2).

Composto remediado	Organismo	Referencia	
Bifenilos policlorados (PCBs)	Pleurotus ostreatus	Stella et al., 2017.	
Insecticida neonicotinoide Te, Se	Phanerochaete sordida Phanerochaete chrysosporium	Mori et al., 2017. Espinosa-Ortiz et al., 2017	
2,4,6-trinitrotolueno (TNT)	Gymnopilus luteofolius, Kuehneromyces mutabilis, e Phanerochaete velutina	Anasonye et al., 2015.	
Oxitetraciclina	Phaeodactylum tricornutum	Santaeufemia, Mera, Abalde, 2016.	
Cd, Cu, Al e Zn	Chlamydomonas reinhardtii	lbuot et al., 2017.	
As	Bacillus arsenicus	Podder; Majunder, 2017.	
Polietileno	Zalerion maritimum	Paço et al., 2017.	
Petróleo	Ochrobactrum intermedium	Bezza; Beukes; Chirwa, 2015.	

Tabela 2. Compostos degradados ou imobilizado por microrganismos

Os microrganismos utilizados para desempenhar a função de biorremediação são conhecidos como Biorremediadores. Eles são considerados uma ótima ferramenta para remediar ambientes contaminados devido a capacidade de se adaptar a diversos ambientes e também pelos os sistemas biológicos apresentados por eles (UQAB et al., 2016), tais como enzimas envolvidas com o stress oxidativo (WAQAS et al.2015).

A biorremedição pode ser realizada *Ex situ* ou *In situ*, sendo que a escolha de uma dessas técnicas depende de vários fatores como características do local, tipo e concentração dos poluentes (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). O tratamento *Ex situ* envolve a remoção do material contaminado para ser tratado em outro lugar, já o *In situ* o material é tratado no local da contaminação onde são aplicados processos microbianos e físicos visando a aceleração da degradação dos xenobiontes (KHOEI et al., 2013).

Esta técnica pode ser mais vantajosa que outras utilizadas no processo de remediação, devido ao fato de ser ecologicamente correta, uma vez que não afeta o equilíbrio dos ecossistemas. Porém para que ela seja eficiente se faz necessário o entendimento de fatores específicos do local a ser tratado, evitando assim efeitos inesperados, como a produção de metabólitos tóxicos ou mudança nas características físicas, que possam alterar as atividades naturais do ambiente (MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016).

2.7 Imobilização de metais pesados

O termo biorremediação, no caso dos metais pesados, pode parecer inapropriado, já que nenhum processo pode degradar ou eliminar elementos inorgânicos; no entanto, em alguns casos sua imobilização mediada pelos microorganismos pode ser uma forma praticável para proteger águas subterrâneas e a cadeia alimentar de uma contaminação (SPROCATI, 2006), uma vez que os sistemas convencionais utilizados na descontaminação de ambientes, tais como precipitação química, filtração, tratamento eletroquímico, adsorção em carvão ativado entre outros, tem mostrado falhas na incorporação do metal, além de possuir custo elevado e geração de outros resíduos tóxicos que requerem transferência (VERMA et al., 2016). Os micróbios podem acumular metais pesados por dois mecanismos, a Biosorção e a Bioacumulação, sendo o primeiro um mecanismo independente energeticamente, onde grupos livres são aderidos a parede celular do organismo, como no caso dos fungos, e o segundo um mecanismo dependente de energia o qual envia o metal para o citoplasma do organismo (RASPANTI et al., 2009). Este acúmulo de metais tanto por biosorção quanto por bioacumulação se torna possível por conta de diferentes mecanismos de tolerância e absorção dos metais, desenvolvidos pelos microrganismos como, indução de enzimas de resposta ao estresse oxidativo, causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas a superóxidos dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa redutase (GR), assim como o aumento dos níveis de antioxidantes, como a glutationa (XU, X. et al., 2015), sequestro/compartimentação do contaminante por meio peptídios intracelulares quelantes de metal, como fitoquelatinas (SHINE et al., 2015), metalotioneínas (SÁCKY' et al., 2014).

2.8 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

EROs, como o radical superóxido (O₂-), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH-), são, sobretudo, subprodutos do metabolismo celular regular, mas podem ser gerados com a destruição do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresse. O principal ponto de produção de ERO_S na célula durante o estresse são as organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com fluxo de elétrons sustentado: cloroplastos e mitocôndrias (SOARES; MACHADO, 2007).

O estresse oxidativo é uma condição em que ROS ou outros radicais livres, são gerados extra ou intracelularmente, exercendo os seus efeitos tóxicos para as células. Estas espécies podem afetar as propriedades da membrana celular e causar danos oxidativos para os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas que podem torná-los não-funcional. No entanto, as células estão equipadas com excelentes mecanismos de defesa antioxidantes, para desintoxicar os efeitos prejudiciais de ERO_s. Tais mecanismos podem ser não-enzimáticos, como por exemplo, glutationa, carotenóides e flavonoides, ou enzimáticos, como por exemplo, superóxido

dismutase, catalase, glutationa peroxidase e glutationa redutase (GIL; TUTEJA, 2010).

2.9 Enzimas Antioxidantes

2.9.1 Enzima Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A enzima Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam quebra de H_2O_2 e O_2 a partir do O_2 , livrando as células da oxidação por este radical (MCCORDE; FRIDOVICK, 1969), para proteger as células vivas dos efeitos citotóxicos do ROS (PARK et al., 2009).

As SOD são classificadas em pelo menos quatro grupos distintos: cobre/ zinco SODs (Cu / Zn - SOD), manganês SOD (Mn - SOD) e ferro SOD (Fe - SOD) e Níquel SOD (Ni – SOD) (FRIDOVICH, 1975; YOUN et al., 1996).

A atividade das SODs vem sendo correlacionada com o aumento da tolerância em plantas expostas a estresses ambientais como, a escassez de água e a exposição de metais pesados, desta forma essa enzima tem sido usada como critério para a seleção de organismos resistentes a tais tensões ambientais (SHARMA; DUBEY, 2005; ZAEFYZADEH et al., 2009).

2.9.2 Enzima Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A catalase (CAT, 1.11.1.6) foi, entre as enzimas antioxidantes, a primeira a ser caracterizada. É uma enzima que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio. Tem alta especificidade para H_2O_2 , mas fraca atividade contra os peróxidos orgânicos. No entanto, a CAT é a única que não requer equivalente celular reduzindo (SHARMA et al., 2012).

Catalases, dependendo das suas propriedades físicas e bioquímicas, são divididos em quatro tipos: catalases heme monofuncionais (ou típica clássicos catalase), catalase-peroxidases (atípica), catalases não-heme (pseudocatalases) e catalases menores (SOOCH et al., 2014). As catalase-peroxidases bifuncionais são encontradas em bactérias e fungos filamentosos, porém, não são observadas em

eucariotos complexos (KAWASAKIA; GUIRRE, 2001). Nas catalases monofuncionais ou verdadeiras, encontram-se duas subunidades, uma com 50-65 kDa e outra com aproximadamente 80 kDa (ANGELOVA et al., 2005).

2.9.3 Enzima Glutationa Redutase (GR EC 1.6.4.2)

A enzima Glutationa redutase (GR- CE 1.6.4.2) faz a redução da glutationa oxidada (GSSG) para a glutationa reduzida (GSH), utilizando NADPH, oxigénio atómico e íons hidroxila, os quais são eliminados pela via glutationa (GAO et al., 2012).

Desta forma a enzima Glutationa redutase possui uma importância na manutenção do equilíbrio entre GSH/GSSG (Figura 2) na qual a GSH atua como agente antioxidante interagindo com o EROs (ERLO, 2006).

Em resposta à exposição a estresses ambientais tem sido relatado um aumento na atividade de GR em diferentes organismos (BLANCH et al., 2013; SEN et al., 2014).

Figura 2. Redução da glutationa oxidada (GSSG) para a glutationa reduzida (GSH), por meio da enzima Glutationa Redutase



Fonte: Adaptado de Adams et al. (2011)
2.10 Tripeptídio GSH

A Glutationa (GSH) é um tripeptídio de baixo peso molecular predominante nas células de todos os organismos vivos (LATINWO et al., 1998), constituído por cisteína, glicina e glutamato (Figura 3), possui uma alta afinidade a íons metálicos devido aos resíduos de cisteína, e pode ocorrer em duas formas, a oxidada (GSSG) e a reduzida (GSH), sendo a forma reduzida a mais importante, uma vez que ajuda a combater o estresse oxidativo causado por íons metálicos, devido à maior afinidade com os mesmos (JOZEFCZAK et al., 2012, KAHAN et al., 2015), sendo esta uma resposta imediata do GSH durante a exposição do organismo a metais pesados, porém o seu papel primordial seria como agente quelante, agindo no sequestro do agente contaminante (XU, P. et al., 2014).

Figura 3. Estrutura química da Glutationa (GSH)



Fonte: Adaptado de Mukwevho et al. (2014)

A GSH serve de substrato para a formação de um peptídeo de baixo peso molecular, a fitoquelatina, que é capaz de complexar e fazer parte dos mecanismos de tolerância a metais pesados, especialmente o Cádmio, (VIEIRA et al., 2015).

As fitoquelatinas formam uma família de péptidos que possuem a sua estrutura básica sendo (γ-Glu-Cys) n-Gly [(PC) n], o qual vem sendo identificado em várias espécies de plantas e microrganismos (COBBETT, 2000).

Este peptídio possui um papel essencial na quelação de metais pesados, por meio de grupos tiol encontrado no aminoácido cisteína (Figura 4), os quais encontram-se no citosol, fazendo o transporte destes xenobiontes para vacúolos. Porém a síntese dessas fitoquelatinas não dependem somente do organismo que se encontra em situação de estresse, mas também do metal causador, sendo o cádmio o melhor ativador dessa síntese, tornado a produção de fitoquelatinas um indicador de contaminação por metais pesados (TURULL et al., 2017).

Figura 4. Modelo de complexo entre o íon Cd (II) de cádmio e uma molécula de fitoquelatina. Cys (cisteína), Glu (ácido glutâmico), Gly (glicina) e S (enxofre)



Fonte: Rodrigo et al. (2013)

Xu, X. et al. (2015) avaliaram a concentração de GSH sob estresse de cádmio em células do fungo *Penicillium chrysogenum* XJ1, onde os resultados apresentaram um aumento de 2,71 vezes a concentração de GSH na concentração de 1mM do metal, além de evidenciar um aumento significativo da relação GSH / GSSG e diminuição da concentração do metal no tratamento. Desta forma concluíram que a GSH e complexos intracelulares GSH dependentes, tais como as fitoquelatinas, podem funcionar na desintoxicação das células do fungo *Penicillium chrysogenum* XJ1 principalmente do metal cádmio, via quelação intracelular do mesmo e eliminação do EROs excessivo induzido por este íon.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento

A coleta das folhas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) foi realizada na Lagoa Salto Grande na cidade de Americana-SP (22°42'19.2"S 47°16'00.5"W) com o auxílio dos funcionários da Associação Barco Escola da Natureza.

Para o isolamento, foram coletados ramos, de cinco plantas, contendo folhas aparentemente sadias, sem manchas ou qualquer tipo de lesão, e em seguida foi utilizado o método de desinfecção, segundo Araújo et. al. (2010). As folhas foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos e microrganismos aderidos a cutina. Em seguida, foram imersas em etanol 70% por um (1) minuto, e posteriormente imersas em solução de hipoclorito 2% de cloro ativo, e mantidas sob agitação por dois

(2) minutos, e em seguida mantidas novamente em etanol com concentração de 70%, por trinta (30) segundos. Finalmente, as folhas foram enxaguadas em água destilada esterilizada e uma alíquota do enxague foi semeada em meio de cultura para verificar a eficiência do processo de desinfecção. Após a desinfecção, a técnica para a extração dos fungos endofíticos foi o isolamento por fragmentação. Com o emprego de bisturi e pinça esterilizada, em câmara de fluxo laminar, 100 fragmentos, com aproximadamente 3 mm², foram cortados das folhas de macrófitas e dispostos em placa de Petri (5 fragmentos por placa) contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar), suplementado com tetraciclina 5 mg/L (seletivo contra bactérias) e incubadas em B.O.D. a 28 °C por cerca de sete (7) dias. A seguir os fungos crescidos a partir dos fragmentos foram purificados por cultivos monospóricos ou de fragmentso de hifas por diluição dos esporos fúngicos ou hifas em suspensão em Tween 80 (Polissorbato 80) (Vetec) 01% (v/v) e então estocadas por dois processos de armazenamento: óleo mineral e método de Castelani, onde o primeiro consistiu em cultivar o isolado fúngico em meio sólido inclinado, e após crescimento, foi adicionado óleo mineral sobre o micélio e mantido em temperatura ambiente. No segundo processo, os fungos crescidos foram fragmentados e colocados em frascos que continham água destilada esterilizada, mantidos em temperatura ambiente.

3.2 Identificação molecular

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985). Em seguida as regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 24 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72° C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foram utilizados os primers ITS-1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 μ L, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 3,7 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP, 0,05 U. μ L-1 de Taq DNA polimerase (Invitrogen),0,4 μ M de cada primer e 3 ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 V.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen).

Os fragmentos amplificados foram purificados por meio de solução de Polietilenoglicol (PEG 8000) (10 g PEG 8000;7,3 g NaCl; 45 mL água deionizada), e sequenciado sequenciadas no LBA – Laboratório de Biotecnologia Animal/ESALQ.

As sequências obtidas foram utilizadas para identificação dos isolados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – http://ncbi.nlm.nih.gov), por meio do Blastn. A identificação das espécies fúngicas foi baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade. As seqüências determinadas foram alinhadas e editadas usando o programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011) com o agrupamento pelo método "neighbor-joining" (SAITOU; NEI, 1987), usando-se "p-distance" para nucleotídeos com a opção "the pairwise gap deletion" e usando bootstrap com 1000 repetições, e foram comparadas à sequencias tipo com base nos resultados observados no BLASTn, as quais foram obtidas nas bases de dados do NCBI.

Como out-group, utilizou-se uma sequência do Filo Chytridiomycota da espécie *Rozella allomycis*, com numero de acesso no Genbank NG_027561.1, grupo distantemente relacionado às sequências fúngicas utilizadas neste trabalho.

3.3 Indice de tolerância

A triagem dos fungos endofíticos resistentes a metais pesados foi realizada segundo Akhtar et al. (2013) com modificações, onde placas com meio BDA suplementado contendo 0, 200, 400, 600 ,800 e 1000 mg/L de concentração de Cd, aplicados na forma de sulfato, foram inoculadas assepticamente com um disco de 6 mm de colônias de 7 dias do endófito, no centro da placa, as quais foram incubadas a 28 ± 1 °C durante 7 dias. Os controles foram placas com meio BDA sem a adição dos metais, e os experimentos foram realizados em triplicata.

O efeito dos metais pesados sobre o crescimento dos isolados foi estimado individualmente, onde foi medida a extensão de colônia radial contra o controle (sem metais), e o índice de tolerância aos metais (It) foi calculado como a proporção do raio da colônia tratada e da colônia não tratada.

$It = D_t / D_u$

Onde Dt é a extensão radial (cm) da colônia tratada e Du é a extensão radial (cm) da colônia sem tratamento.

3.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd

O acúmulo de metais pesados foi observado de acordo com o método de Joshi et. al. (2011), com modificações. O isolado com maior tolerância frente ao Cd foi avaliado quanto ao acumulo a sua maior toxicidade, em meio BD (Batata Dextrose) contendo 0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L de concentração de Cd, aplicado na forma de sulfato, o qual foi dispensado em lotes de 100 ml, em frascos de 250 ml, que foram devidamente autoclavados.

Após serem autoclavados estes frascos foram inoculados com discos de 6 mm de colônias de 7 dias dos endófitos, e incubados a 28°C durante 3,9 e 15 dias a 150 rpm em agitador orbital. O crescimento fungico foi colhido por meio de filtração utilizando de filtro Whatman N°. 42, e enxaguado com água destilada de 3 a 4 vezes e seco em estufa de ar quente a 80 °C durante 18 h e pesado em balança semianalítica. O sobrenadante foi coletado em frascos esterilizados e

digerido com ácido nítrico e ácido perclórico (razão 3:1), e novamente filtrado, e a concentração de metais no filtrado foi estimada por *Inductively Coupled PlasmaOptical Emission Spectrometry* (ICP-OES).

A quantidade de metal adsorvido por grama de biomassa, foi obtida por meio da equação

q(Mg/g)= V (Ci-Cf)

Μ

Onde: q = Quantidade de metal adsorvido por grama de biomassa (mg/g) V = Volume da solução contendo o metal (L), Ci = Concentração inicial de metal (mg/L) Cf = Concentração final de metal (mg/L) e M = Massa da biomassa (g)

3.5 Atividades das enzimas do sistema antioxidante

As enzimas que tiveram as suas atividades analisadas foram CAT, SOD e GR. As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria.

3.5.1 Extração de proteínas totais

Frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio BD suplementado com 0, 200 e 400, mg/L de CdCl₂ foram inoculados com colônias de 6 mm do fungo previamente selecionado, e incubados a 28°C em agitador orbital por 3, 9 e 15 dias. Em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro (Whatman nº 1), separando desta forma o micélio do fungo.

O micélio foi triturado em nitrogênio líquido e adicionado o tampão de extração fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP, na proporção de 1 g de amostra/4 mL de tampão e em seguida centrifugado a 8000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante

foi dividido em alíquotas e estocadas em freezer -80°C até o momento das análises (POMPEU et al., 2008).

A concentração de proteína em todas as amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.5.2 Gel SDS-PAGE- (10% poliacrilamida)

Foram utilizados os géis de *resolução* composto por: 5,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9, 200 µL de SDS (10%) e 10,0 mL de água destilada, 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%). e o de *empilhamento* composto por: gel polimerizado, 1 mL da solução 40% de acriamida/bis-acrilamida (Sigma) citada anteriormente, 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8, 100 µL de SDS (10%) e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

3.5.3 Atividade da enzima Superóxido Dismutase – SOD em PAGE não desnaturante

A atividade da SOD em PAGE não desnaturante (10%) utilizou como padrão 2 unidades de SOD de fígado de boi (Sigma) e 50µL do extrato proteico de cada tratamento, corrido a 4 °C (15 mA), por 6 h, após a corrida os géis foram enxaguados em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% de TEMED, por 30 minutos e em seguida enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por até o aparecimento de bandas brancas e coloração do gel. As isoformas de SOD foram distinguidas por meio da sensibilidade à inibição por cianeto de potássio 2 mM (KCN) e 5 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3.5.4 Atividade da enzima Superóxido Dismutase – SOD, em espectrofotômetro

A atividade de SOD em espectrofotômetro foi realizada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), acrescentando 50 µL de extrato de proteína para uma mistura de 5 mL com tampão de fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,8, Contendo metionina 13 mmol.L⁻¹, NBT 75 µmol.L⁻¹, EDTA 0,1 mmol.L⁻¹, riboflavina 2 Mmol.L⁻¹. A reação foi realizada a 25°C em uma câmara (coberta de papel alumínio) com uma luz fluorescente de 15 W, após 5 minutos de exposição à luz, a luz foi desligada e o composto formazano (azul), produzido pela fotorredução NBT, foi medido a 560 nm, o controle negativo foi uma amostra com todos os reagentes, sem extrato de proteína, mantidos em escuro durante o mesmo período de tempo e foi subtraído de todas as amostras que receberam luz.

3.5.5 Atividade da enzima Catalase – CAT em PAGE não desnaturante

A atividade da CAT em PAGE não desnaturante (10%), utilizou como padrão 1 unidades de CAT e 50 µL do extrato proteico de cada tratamento, corrido a 4°C (15 mA) por 22 horas, após a corrida, os géis foram enxaguados em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida incubados em uma mistura de 1% FeCl₃ e 1% K₃Fe por 10 minutos e em seguida lavado novamente em água deionizada. Para parar a reação o gel em seguida foi lavado em Ácido acético 7% durante cinco minutos.

3.5.6 Atividade da enzima Catalase – CAT em espectrofotômetro

A atividade de catalase foi determinada por espectrofotometria, conforme Azevedo et al. (1998). A solução de reação foi formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (25%), com 25 µL de extrato protéico, a temperatura de 25°C. A atividade foi determinada através da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por meio de alterações na absorbância a 240 nm.

3.5.7 Atividade da enzima Glutationa Redutase – GR

A atividade da GR foi determinada pelo método de espectrofotometria como sugerido por Lee e Lee (2000), onde de 50 μ L de extrato proteico foi adiconado a 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 μ L de 5,5'-dithio-bis (2-ácido nitrobenzóico - DTNB) a 1 mM, 100 μ L de glutationa oxidada (GSSG) 1 mM e 100 μ L de NADPH 0,1 mM, a 30°C e monitorada por meio da redução de glutationa oxidada na absorbância de 412 nm.

3.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG

Os teores reduzidos de glutationa (GSH) e glutationa oxidada (GSSG) foram determinados espectrofotométricos de acordo com Anderson (1985) com algumas modificações. Os endófitos tratados, nas mesmas condições usadas para a extração de proteínas, foram homogeneizados em um pilão e adicionado ácido sulfossalicílico a 5% (1 mL). O homogeneizado foi centrifugado a 10 000 g a 4 ° C durante 20 min e foram adicionados 200 μ L do sobrenadante a 1,8 mL de tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) contendo EDTA 0,5 mM e 100 μ L de 5,5'- Ácido ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB). A mistura foi mantida no escuro durante 5 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi monitorizada a 412 nm. Em seguida, as mesmas cubetas receberam 100 μ L de NADPH 0,4 mM e 2 μ L de GR (205 U. mg-1) e as misturas foram mantidas no escuro durante 20 min. No final deste período, a absorbância foi medida a 412 nm. O conteúdo de GSH foi calculado a partir de uma curva padrão construída usando concentrações de GSH na faixa 0-1 mM.

3.7 Microscopia eletrônica e microanálise de Raio-X (EDS/EDX)

Foram utilizados a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão para avaliar a morfologia da biomassa.

A microanálise de Raio-X (EDS/EDX) quantificou absorção e adsorção do metal cádmio, após o tratamento com esta espécie metálica cádmio em questão, afim de analisar qualitativamente o processo de acúmulo.

3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram submetidas ao protocolo de fixação para amostras biológicas, onde foi utilizado o fixador gluteraldeído 2,5 %. Após três dias de fixação as amostras foram lavadas por três passagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato 0,05 M As amostras foram submetidas a desidratação em soluções concentradas crescentes de acetona/água (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo por 10 minutos em cada uma, sendo que na solução a 100 % as amostras foram passadas por três vezes. As amostras também foram acondicionadas em gaiolas individuais, devidamente identificadas para secagem ao ponto crítico utilizando o aparelho Baltec EM CPD 300, procedimento descrito por Kitajima e Leite (1999), e metalizadas com ouro em metalizador Baltec SCD 050. O equipamento utilizado para análises de microscopia de varredura foi o JEOL JSM-IT300LV, no Núcleo de Apoio à Pesquisa /Microsocopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, sob a coordenação do Professor Dr. Elliott Watanabe Kitajima.

3.7.2 Análises de amostras em microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram fixadas nas mesmas condições utilizadas para a microscopia de varredura. Em seguida as amostras foram lavadas com três passagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato 0,05 M e imersão em uma solução de 56 tetróxido de ósmio (OsO4) 1 % em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 por uma hora, procedimento realizado em capela na temperatura ambiente 25 ± 2 °C. Na fase seguinte, foram coradas "em bloco" com acetato de uranila 2,5 % em água overnight. As amostras fixadas em OsO4 foram lavadas com água destilada e submetidas a soluções concentradas crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Após a desidratação as amostras foram incluídas em resina Spurr dentro do próprio ependorff. Os cortes ultrafinos (60-90 nm) foram feitos em ultramicrótomo Leica UCT com lâminas de vidro e depositados em telas de cobre recobertas com colodion, contrastados com acetato de uranila 2,5 % e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As secções foram examinadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM-900 e as imagens digitalizadas.

3.7.3 Microanálise de Raio-X (EDS/EDX)

As amostras passaram por processo de fixação, desidratação e ponto crítico nas mesmas condições usadas para a microscopia de varredura. Após este processo as amostras foram metalizadas em carbono no metalizador Baltec MED 010 e anilisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-IT300LV, com acessório para microanálise de raio X (EDX).

3.8. Interação planta fungo

3.8.1 Produção de AIA

Para verificar a produção de ácido indol acético (AIA), o isolado endofítico (CM3) *Mucor* sp., foi inoculado em frascos contendo meio BD (Batata Dextrose) enriquecido com triptofano (100 µg/mL-1) como precursor, e incubado a 28oC em agitação constante de 150 rpm por 48 h, em triplicata. Após o período de cultivo, uma alíquota de 2 mL foi retirada de cada amostra e centrifugada durante 10 minutos, a 1200 rpm, em seguida, 900 µL do sobrenadante foi misturado com 400 µL do reagente de Salkolwisk e mantidos no escuro por 30 minutos, e em seguida foi realizada a leitura das amostras em Espectrofotômetro com o comprimento de onda 520 λ . A quantificação foi feita por uma curva padrão a partir de uma solução de AIA contendo 1 mg/mL. Padrões de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL foram preparados e suas absorbâncias medidas a 520 nm.

3.8.2 Ensaio de hidropônia

O bioensaio em hidroponia foi realizado para quantificar o efeito do isolado endofítico *Mucor* sp. na tolerância do metal Cd nas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, por meio de hidroponia. Este cultivar foi utilizado devido a sua sensibiliadad ao metal Cd (PIOTTO, 2012).

As sementes de tomate foram desinfectadas em superfície com 70% de etanol para 1min, hipoclorito de sódio 2,5% durante dois min, etanol a 70% durante 1

min e em seguida lavadas com água destilada esterelizada. As sementes foram então inoculadas com o isolado endofítico *Mucor* sp.: 1 x 10⁵ conídios, contados em câmara de Neubauer, e incubado à temperatura ambiente durante 1 h, sendo o controle negativo inoculado em água destilada estéril. As sementes foram semeadas em um substrato de vermiculita e mantidas em estufa a 25 °C. Após 21 dias em vermiculita, as plantas de tomate foram transferidas para bandejas de 12 L contendo nutriente

Hoagland e Arnon Solução a 10% de força iónica e pH 6. As concentrações de nutrientes foram aumentadas diariamente por até três dias para permitir a adaptação das plantas. No quarto dia, a solução foi alterada para 50% força iônica e suplementado com CdCl₂ 0 ou 30 μM. Totalizando quatro tratamentos: (i) - *Mucor* sp.-Cd; (li) - *Mucor* sp. + Cd; (lii) + *Mucor* sp. -Cd e + *Mucor* sp. + Cd. Oito dias após a adição de Cd, três plantas de cada tratamento foram amostradas e divididas em raízes, frações de folhas e caule.

3.8.3 Medição de biomassa

Os tecidos da planta foram pesados logo após a retirada do tratamento (peso fresco) e secos a 55 °C por 5 dias para atingir um peso constante e depois pesado novamente em balança semi-analítica.

3.8.4 Análises das raízes

As análises das raízes foram feitas via scanner profissional Epson® Expression 11000XL., onde as raízes foram espalhadas em camada transparente de água em bandeja (30 cm x 20 cm), e sua imagem foi capturada em resolução de 400 dpi (pontos por 61 polegada).As imagens foram analisadas para comprimento total de raízes (CT), comprimento de raízes laterais (CRL), comprimento de raízes axiais (CRA), área superficial total de raízes (AS) e diâmetro médio total (DM) utilizando o software WinRHIZO Arabidopsis (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada), conforme a metodologia proposta por Trachsel et al. 2009.

3.8.5 Acumulo de Cd na planta

As concentrações de Cd em raízes, folhas e hastes de tomate foram determinadas pelo ICP-OES, onde as frações das plantas foram secas e submetidas a uma digestão durante a noite em uma solução de ácido nítrico: ácido perclórico (3:1) com aquecimento.

3.8.6 Reisolamento

Para o reisolamento foi utilizado o método de desinfecção com hipoclorito de sódio, segundo Araújo et. al., 2010, e em seguida os fragmentos foliares, caulinares e radiculares foram depositados em meio BDA, suplementado com tetraciclina 5 mg/L (seletivo contra bactérias) e 200 mg/L de higromicina (seletivo para *Mucor* sp.) e incubadas em B.O.D. a 28° C.

3.9 Análise estatística

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando o programa R (R Core Team 2014). As médias foram consideradas significativamente diferentes após teste de Scott-Knott e Tukey a um nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento

Do total de 300 fragmentos de folhas amostradas 24 apresentaram crescimento fungico demonstrando uma frequência de colonização de 8%. As ausências de crescimento microbiano nos controles negativos demonstraram a eficiência do processo de desinfecção superficial (Figura 5).

Desta forma a partir dos endófitos isolados de *E. crassipes*, quinze foram selecionados de acordo com suas características morfológicas, como a coloração da colônia, formação de pigmento, o desenvolvimento e crescimento da colônia micelial em BDA.

Figura 5. A) *E. Crassipes* coletada na Lagoa Salto Grande – Americana SP. B, C) Fungos endofíticos isolados de *E. Crassipes* provenientes da Lagoa Salto Grande – Americana SP. D) Água do último enxague das folhas como controle de desinfecção



4.2 Identificação

Usando dados a partir da análise do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e por meio da análise BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) do banco de dados GenBank, foi possível identificar 15 fungos isolados, do total de 15 endófitos estudados (Tabela 3), os quais foram depositados no mesmo banco de dados com os códigos de acesso de MG594503 à MG594517.

Tabela 3. Isolados endófiticos de *E.crassipes*, identificados em relação ao gênero ou espécie e a percentagem de identidade encontrada no site NCBI (National Center for Biotechnology Information) website

Isolado	Seqüências de fungos estreitamente relacionadas	Acesso	Identidade (%)
CM1	Arthrinium sp.	AY513946.1	99
CM2	<i>Fusarium</i> sp.	LN886534.1	100
CM3	Mucor sp.	JN315012.1	99
CM4	<i>Fusarium</i> sp.	KC341968.1	100
CM5	Fusarium fujikuroi	KP638348.1	99
CM6	Microsphaeropsis arundinis	JQ344353.1	100
CM7	Plectosphaerella cucumerina	KT699136.1	100
CM8	Plectosphaerella cucumerina	KT699136.1	100
CM9	<i>Mucor</i> sp.	KP881428.1	100
CM10	Plectosphaerella cucumerina	KM277966.1	100
CM11	Microsphaeropsi arundinis	KJ439122.1	100
CM12	Fusarium equiseti	KM396306.1	100
CM15	Plectosphaerella cucumerina	JX406529.1	99
CM16	Plectosphaerella cucumerina	KT699136.1	100
CM17	Fusarium chlamydosporum	FJ545398.1	100

Foram encontrados cinco gêneros diferentes, sendo eles *Arthrinium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Microsphaeropsi* e *Plectosphaerella*, dos quais cinco isolados foram identificados a nível de gênero, sendo eles, o isolado CM1 pertencente ao gênero *Arthrinium*, os isolados CM2, CM4 ao gênero *Fusarium* e os isolados CM3 e CM9 ao gênero *Mucor*. 10 fungos foram identificados a nível de espécie, sendo eles os isolados CM6 e CM11 pertencentes a espécie *Microsphaeropsi arundinis*, os isolados CM7, CM8, CM10, CM15 e CM16 a espécie *Plectosphaerella cucumerina*, e os isolados CM5, CM12 e CM17 pertencentes as espécies *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium equiseti e Fusarium chlamydosporum* respectivamente (Figura 6 e Tabela 3).

Figura 6. Árvore filogenética construída com sequências de aproximadamento 500 bp, dos isolados endofíticos de *E. crassipes* e seqüências de distância para nucleotídeos, com a opção de exclusão de vazio pairwise. Os números acima e abaixo de cada nó indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação nas análises de bootstrap de 1000 repetições



48

0.10

4.3 Resistência ao metal Cd

Os 15 isolados foram ensaiados quanto ao Índice de tolerância (It) para o metal Cádmio, sendo que apenas os isolados CM3 e CM9 apresentaram tolerância significativa a este metal, na concentração de 1000 mg/L lt maior ou igual a 0,4 (Figura 7). Os demais isolados não apresentaram crescimento frente ao metal Cd.

Figura 7. Índice de tolerância dos isolados endofíticos (It) nas concentrações 0,250, 500, 1000, 2000 and 4000 mg/L de CdCl₂ (I =barra de erro)



4.4. Acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações do metal Cd

Para a avalição de acúmulo e crescimento frente a diferentes concentrações e períodos de incubação foi utilizado o isolado CM3 identificado molecularmente como *Mucor* sp., devido a sua maior resistência aos diferentes metais quando comparado aos outros 14 isolados.

As maiores concentrações do metal cádmio no micélio do endófito (CM3) *Mucor* sp. foram encontradas nos tratamentos 1000 mg/L no período de incubação de 3 dias e 1000 mg/L no período de incubação de 15 dias, a quais apresentaram os valores de 956 mg/g e 933 mg/g respectivamente. Por outro lado, as menores concentrações encontradas no micélio do endófito foram de 46 mg/g no tratamento 200 mg/L 15 dias e 58 mg/g no tratamento 200 mg/L 9 dias (Figura 8 e Tabela 4).

Em relação ao crescimento fungico, os tratamentos que produziram maior massa seca em (g) de *Mucor* sp. foram os de 200 mg/L, com 15 dias de incubação, e 200 mg/L de cadmio, com 9 dias de incubação, onde foram obtidos (0,43 g) e (0,34 g) respectivamente. Já as menores taxas de crescimento em (g) foram observadas em todos os tratamentos, os quais obtiveram valores estatisticamente iguais, no período de incubação de 3 dias e na concentração de 1000 mg/L no período de incubação de 15 dias (Figura 8 e Tabela 4).

Figura 8. Absorção (q = (mg / g) de Cd pelo do isolado endofítico CM3 (*Mucor* sp.) em meio líquido contendo as concentrações 0, 200, 400, 600, 800 e 1000 (mg / L) de CdCl₂, após 3, 9 e 15 dias (I = barra de erro). (B) Crescimento em (g) do isolado endofítico CM3 (*Mucor* sp.) frente a diferentes concentrações e períodos de incubação. Letras minúsculas, diferentes, no topo das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



Concentração	3	dias	9	dias	15	5 dias
de Cd mg/L	Massa CM3 (g)	Cd biossorvido (mg/g)	Massa CM3 (g)	Cd biossorvido (mg/g)	Massa CM3 (g)	Cd biossorvido (mg/g)
0	0.43±0,16	0±0	0.43±0,06	0±0	0.60±0,02	0±0
200	0.15±0,15	46±5,2	0.34±0,03	58±5,9	0.43±0,05	131,6±18,7
400	0.10±0,1	130±21,1	0.27±0,01	144±8,1	0.31±0,05	370±24
600	0.10±0,07	336±15,4	0.23±0,05	264 ± 5,4	0.20±0,09	580±31
800	0.13±0,05	635±15,1	0.14±0,06	535±23,2	0.16±0,03	598±19,8
1000	0.10±0,03	956±11,4	0.12±0,03	813±18,6	0.10±0,08	933±9,8

Tabela 4. Crescimento do isolado endofítico CM3 e absorção de Cd em meio contendo diferentes concentrações após 3, 9 e 15 dias. Os valores são médias e ± são os desvios padrão das triplicadas

4.5 Efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes de *Mucor* sp.

O pré tratamento dos géis em KCN e H₂O₂ antes da revelação permitiu a classificação das isoenzimas de SOD em Mn-SOD e Fe-SOD, uma vez que a isoforma Mn-SOD é resistente ao tratamento a ambos os inibidores, enquanto a isoforma Fe-SOD é resistente apenas ao KCN (Figura 9). Por meio da análise do padrão de proteína SOD em PAGE foi possível notar em ambos os tratamentos com Cd (concentrações de 200 e 400 mg/L), e nos controles, sem adição de metal, apresença de bandas, que demosntram a atividade dessas duas isoformas (Mn-SOD e Fe-SOD), tanto nos controles quanto nos tratamentos. (Figura 9).

Quando analisada por meio de espectrofotometria, pode-se notar uma diferença significativa no tratamento de 400 mg/L em um período de 3 dias, o qual demonstrou maior atividade com 0,292 Und SOD, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 10).

Figura 9. (A) Caracterização das isoenzimas da SOD ,(B) Gel de atividade da enzima SOD, onde (P) corresponde ao padrão de peso molecular, (1, 2 e 3) correspondem as concentrações (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de loreto de cádmio (CdCl₂) respectivamente.Os números romanos (I e II) correspondem às isoformas de SOD, MnSOD e FeSOD, respectivamente



Figura 10. Efeito das dosagens de (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de cádmio na atividade de SOD no micélio do isolado endofítico (CM3) *Mucor* sp. nos períodos de tempo 3, 9 e 15 dias, avaliado por espectrofotometria. Diferentes letras maiúsculas e minúsculas em cima das colunas indicam que em 3, 9 e 15 dias de exposição ao CdCl₂, os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



Em análise por meio de PAGE foram encontradas cinco isoformas da enzima CAT, sendo a ultima banda (V) mais evidente nos tratamentos, mostrando que o aparecimento desta isoforma pode estar relacionada a adição do metal Cd nos tratamentos (Figura 11).

Quando analisada por meio de espectrofotometria, foi observada uma diferença no tratamento de 400 mg/L em um período de 15 dias, o qual demonstrou maior atividade com 273,21 umol/min/mg de proteína, estando assim, acima dos valores apresentados pelos demais tratamentos, os quais não apresentaram diferença estatística entre eles (Figura. 12).

Figura 11. Gel de atividade da enzima CAT, onde (P) corresponde ao padrão de peso molecular, (1, 2 e 3) correspondem as concentrações (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de cloreto de cádmio (CdCl₂) respectivamente. Os números romanos (I, II, III, IV e V) correspondem às isoformas da CAT



Figura 12. Efeito das dosagens de (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de cádmio na atividade de CAT no micélio do isolado endofítico *Mucor* sp. nos períodos de tempo 3, 9 e 15 dias, avaliado por espectrofotometria. Diferentes letras maiúsculas e minúsculas em cima das colunas indicam que em 3, 9 e 15 dias de exposição ao CdCl₂, os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



Em relação à enzima glutationa redutase (GR) monitorada por meio da redução de glutationa oxidada na absorbância de 412 nm. em espectrofotômetro, ficou evidente a maior atividade desta enzima na presença de 400 mg/L em um período de 15 dias, sendo a concentração em umol/ min/ mg proteína de 1,83 (Figura 13).

Figura 13. Efeito das dosagens de (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de cádmio na atividade de GR no micélio do isolado endofítico (CM3) *Mucor* sp. nos períodos de tempo 3, 9 e 15 dias, avaliado por espectrofotometria. Diferentes letras maiúsculas e minúsculas indicam que em 3, 9 e 15 dias de exposição ao CdCl₂, os valores são diferentes p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



4.6 Determinação dos teores de GSH/GSSG

Os tratamentos com o cádmio mostraram um aumento significativo nas concentrações de GSSG e GSH no micélio do endófito (CM3) *Mucor* sp., quando comparados com os controles, e também um aumento na relação GSH/GSSG, disponibilizando uma maior concentração de GSH, aumentando o potencial antioxidante do fungo (Figura 14).

Em relação ao GSSH pode-se notar um aumento em suas concentrações de acordo com o aumento das concentrações do metal, sendo 0,079 mM/L no tratamento de 400 mg/L no período de 3 dias, a maior concentração, seguida de 0,055 mM/L no tratamento de de 400 mg/L no período de nove dias e 0,028 mM/L também na concentração de 400 mg/L no período de 15 dias de tratamento. Os resultados indicam a diminuição na concentração de GSSH com o aumento dos dias de tratamento.

A concentração de GSH também foi maior no tratamento 400 mg/L no período de 3 dias, sendo de 0,11 mM/L, seguido de 0,08 mM/L e 0,053 nos tratamentos 400 mg/L no período de 9 dias e 400 mg/L 15 dias respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Efeito das dosagens de (0 Controle, 200 e 400 mg/L) de cádmio na atividade de GSH Reduzida (A) e GSH Total (B), no micélio do isolado endofítico *Mucor* sp. nos períodos de tempo 3, 9 e 15 dias, avaliado por espectrofotometria. Diferentes letras em cima das colunas indicam que em 3, 9 e 15 dias de exposição ao CdCl₂, os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



4.7 Microscopia eletrônica

4.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura mostrou uma mudança significativa na morfologia do endófito *Mucor* sp. em todos os tratamentos (200, 400 mg/L CdCl₂) e tempos (3,9 e15 dias) quando comparados aos controles, sem adição de CdCl₂ (Figura 15), tornando evidente que tal mudança na estrutura do fungo foi induzida pela presença do metal cádmio.

Figura 15. Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), (A) Controle sem $CdCl_2$ (B) 200 mg/L de $CdCl_2$, e (C) na presença de 400 mg/L de $CdCl_2$, no período de 3 dias de tratamento, (D) Controle sem $CdCl_2$ (E) 200 mg/L de $CdCl_2$, e (F) na presença de 400 mg/L de $CdCl_2$, no período de 9 dias de tratamento, (G) Controle sem $CdCl_2$ (H) 200 mg/L de $CdCl_2$, e (I) na presença de 400 mg/L de $CdCl_2$, no período de 15 dias de tratamento



4.7.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou no controle, sem adição de CdCl₂, uma estrutura celular bem definida, onde pode-se notar uma parede celular delgada e bem compactada, e no interior da célula nenhuma evidencia de resíduos de metal pesado (Figura 16).

Diferentemente do controle, no tratamento com o metal cádmio pode-se notar mudanças morfológica, principalmente na parede celular, na qual foi observado um aumento significante em sua espessura. Além das mudanças morfológicas, ficaram evidentes regiões onde os elétrons foram desviados por porções que contêm átomos de elevado peso molecular, formando aglomerados escuros, chamados de corpos eletrodensos, e também resíduos aderidos ao interior da parede celular (Figura 16), os quais podem estar relacionados ao acúmulo do metal Cd.

Figura 16. Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do isolado endofítico Mucor sp., (A) Controle 0 mg/L de CdCl2 (B) 400 mg/L de CdCl2 15 dias (PC, Parede celular; ED, Corpos eletrodensos; M, Metal Cádmio)



4.7.3 Microanálise de Raio-X (EDS/EDX)

A microanálise de Raio-X (EDS/EDX) confirmou a existência de uma quantidade do metal cádmio ligada a superfície celular do endófito *Mucor* sp., quando o mesmo foi tratado com 200 e 400 mg/L CdCl₂ em três, nove e 15 dias. Esta análise também demostrou a ausência deste metal nos controles (Figuras 17 A-G).

Figura 17. Espectro de radiação ultra-dispersiva (EDX) do isolado endofítico (CM3) *Mucor* sp. cultivado (A) na ausência do cádmio (Cd), (B) na presença de 200 mg/L de CdCl₂, e (C) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, no período de 3 dias de tratamento, (D) na presença de 200 mg/L de CdCl₂, e (E) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, no período de 9 dias de tratamento, (F) na presença de 200 mg/L de CdCl₂, e (C) na presença de 400 mg/L de CdCl₂, no período de 15 dias de tratamento



4.8. Interação planta-fungo

4.8.1 Produção de AIA

A quantificação feita a partir da curva padrão de AIA contendo 1mg/mL, utilizando os padrões de 50 μg/mL, 100 μg/mL, 250 μg/mL e 500 μg/mL e medidos 520 nm (Figura 18) determinou uma concentração de AIA durante o crescimento do endófito de 416,3 μg/mL.

Figura 18. Sobrenadante misturado a 400 µL do reagente de Salkolwisk, após 30 minutos no escuro



4.8.2. Ensaio de hidropônia

Oito dias após a adição de 30µM de CdCl₂ as plantas de tomate (*S. lycopersicum*), inoculadas com o isolado *Mucor* sp., apresentaram um melhor crescimento que as não inoculadas com o endófito (Figura 19). Além disso foi possível notar que a clorose induzida pelo Cd também não foi atenuada de forma significativa, nas plantas inoculadas tratatadas com o metal (Figura 20). Embora o endófito não tenha sido capaz de atenuar os sintomas de contaminção nas plantas tratadas com o metal, ele demonstrou no controle, sem o tratamento prévio com o xenobionte, um aumento tanto na massa seca de raíz e caule quanto na massa fresca, e também demonstrou um aumento na circunferência do caule, nas plantas de tomate (Figuras 19 a 21).

Figura 19. Raizes e parte aérea de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 μ M CdCl₂. (A) massa seca parte aérea, (B) massa fresca parte aérea, (C) massa seca raiz, (D) massa fresca raíz. Diferentes letras em cima das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



Figura 20. Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 μ M CdCl2. (A) - *Mucor* sp.-Cd; (B) - *Mucor* sp. + Cd; + *Mucor* sp. -Cd (D) + *Mucor* sp. + Cd



Figura 21. Circunferência do caule de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 μ M CdCl₂. Diferentes letras em cima das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



Outros parâmetros aferidos após oito dias de tratamento com 30μ M de CdCl₂ nas plantas de tomate, visando avaliar o efeito da inoculação do endófito *Mucor* sp., foram a Área superficial, Comprimento, Diâmetro, Raiz lateral, Raiz axial e Volume das raízes. Entretanto dentre esses parâmetros apenas o comprimento da raiz se mostrou significativo para p <0,05 no tratamento + *Mucor* sp + Cd, em relação ao tratamento - *Mucor* sp. + Cd (Figuras 22, 23 e 24). Contudo o tratamento controle +*Mucor* sp. – Cd, demostrou um efeito significativo para p <0,05 para o crescimento, assim como visto nas variáveis peso seco e fresco da parte aérea e da raiz, nos parâmetros área superficial, Comprimento e Volume das raízes (Figuras 22 e 23). E em relção a raízes laterias e axial, o efeito não foi significativo para p <0,05, na avaliação da atenuação dos sintomas de contaminação com o metal Cd e também no efeito de promoção de crescimento para os tratamentos + *Mucor* sp + Cd e +*Mucor* sp. – Cd (Figura 24).

Figura 22. Raizes de *Solanum lycopersicum* cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 μ M CdCl₂. (A) área superficial (B) comprimento (C) diâmetro (D) volume. Diferentes letras em cima das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



Figura 23. Raizes de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 μ M CdCl₂. (A) - *Mucor* sp.-Cd; (B) - *Mucor* sp. + Cd; (C) + *Mucor* sp -Cd (D) + *Mucor* sp + Cd.



Figura 24. Raizes de *Solanum lycopersicum* cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 µM CdCl₂. (A) raiz lateral (B) raiz axial. Diferentes letras em cima das colunas indicam que os valores são diferentes em p <0,05, pelo teste de Scott-Knott



4.8.3. Quantificação do metal Cd nas plantas de tomate (Solanum lycopersicum cultivar Calabash Rouge)

Na avaliação da quantidade de Cd absorvido nas plantas de tomate (*S lycopersicum*) com tratamento + *Mucor* sp. + Cd as raízes da planta não demonstraram uma maior eficiência na absorção do metal referido. Porém em relação a parte aérea o tratamento + *Mucor* sp. + Cd, apresentou uma diferença significativa estatisticamente (p< 0.05), quando comparada principalmente com o tratamento - *Mucor* sp. + Cd, demonstrando que a presença do endófito na parte aérea da planta pode ter influenciado na acumulação do metal (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação do metal Cd em tomate (Solanum lycopersicum) cultivar Calabash Rouge, crescidas em sistema hidropônico e amostradas oito dias após o tratamento com 30 µM CdCl₂

Tratamento	Raiz	Parte aérea
_	Cd (mg/kg)	Cd (mg/kg)
- <i>Mucor</i> sp Cd	0,67±0,02c	0,15±0,02c
- <i>Mucor sp.</i> + Cd	1238±0,01a	405±2,8b
+ <i>Mucor</i> sp Cd	0,64±0,05c	0.18±0,01c
+ <i>Mucor</i> sp. + Cd	1187±0,01b	440±1,1a

Médias de três repetições seguidas de erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam que os valores são diferentes (p <0,05, pelo teste de Scott-Knott).

4.8.4 Reisolamento

Do total de 40 fragmentos de caulinares amostrados, quatro apresentaram crescimento fungico, com uma frequência de colonização de 10%, enquanto nas raízes a frequência de isolamento foi de 8,6% e nas folhas um total de 7,5% (Figura 25 e Tabela 6). As ausências de crescimento microbiano nos controles negativos demonstram a eficiência do processo de desinfecção superficial.

Além da morfologia do organismo a presença de higromicina 200 mg/L no meio BDA assegura que os organismos re-isolados sejam o endófito *Mucor* sp., uma vez que o microrganismo usado neste trabalho se mostrou resistente a este antibiótico em testes anteriores.

Tabela 6. Frequencia de colonização do reisolamento do endófito Mucor sp., dos
órgãos da planta modelo de tomate (Solanum lycopersicum) cultivar Calabash
Rouge. (40 fragmentos utilizados)

Órgão vegetal	Frequência de colonização
Raiz	8,6%
Caule	10%
Folha	7,5%

5. DISCUSSÃO

Os microrganismos endofíticos podem ser definidos como organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem lhes causar danos aparentes. Desta forma as plantas encontradas em ambientes contaminados são dependentes destes microrganismos para a sua sobrevivencia (DENG; CAO, 2017), uma vez que estes microrganismos, principalmente os fungos, são conhecidos por remover de forma eficaz contaminantes como metais pesados (CHEN et al., 2017).

Neste estudo foram isolados fungos endofíticos da macrófita aquática *E. crassipes* proveniente da lagoa Salto Grande, onde já foi descrita a presença de metais pesados (MARTINS et al., 2003). Os resultados demonstraram a existência de cinco gêneros diferentes, dentre os quais apenas um (*Plectosphaerella*) foi possível identificar no trabalho feito por Almeida et al. (2015), que também isolaram

fungos endofíticos da macrófita aquática *E. crassipes*, esta proveniente da planície de inundação do Rio Paraná, indicando uma diferença significante entre os gêneros encontrados nas plantas de mesma espécie que se encontram em condições ambientais bem distintas.

A proposta de isolar fungos endofíticos da planta *E. crassipes* proveniente de um local contaminado com metais pesados, foi de selecionar microrganismos capazes de tolerar diferentes concentrações desses metais, especificamente o cádmio, uma vez que esta é uma espécie flutuante que possui uma grande importância ecológica que tem sido notada devido suas propriedades filtradoras.

Estudos têm demonstrado a eficiência da macrófita *E. crassipes* na diminuição de metais pesados de efluentes industriais (OLIVERO; SOLANO, 1998; TRIPATHI, 2011), as quais podem estar ligadas aos microrganismos endófiticos, que são considerados essenciais para a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas em ambientes contaminados por metais pesados (XU, R. et al., 2015).

Um dos isolados endofiticos encontrados no presente trabalho foi o fungo do gênero *Mucor* que vem chamando a atenção por possuir inúmeras características biotecnológicas, dentre elas a produção de enzimas como lipases, amilases e proteases (EBRAHIM, 2014; BABAKI et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2016; GARCIA-GALAN et al., 2017; SAMADI et al., 2017). Além disso, fungos deste gênero têm sido isolado de ambientes contaminados com compostos organoclorados e metais pesados, demonstrando a resistência e a capacidade de transformar xenobióticos complexos, além de possuir a capacidade de biosorção de metais (YAN; VIRARAGHAVAN, 2003; DENG et al., 2011; ZAHOOR et al., 2017).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o fungo endofítico *Mucor* sp. apresentou uma alta absorção do metal cádmio, quando exposto a diferentes concentrações deste metal (Figura 8 e Tabela 4).

Resultados semelhantes foram apresentados por Deng et al. (2013), com o fungo *Mucor* sp. isolado da planta *Brassica chinensis*, oriunda de solo contaminado com diferentes metais, o qual obteve uma alta absorção do metal cadmio quando exposto a uma concentração de 2mM deste metal. Zahoor et al. (2017) também com o isolado endofítico *Mucor* sp. obtiveram uma remoção de 60 a 87% dos metais pesados (Cr⁶+), manganês (Mn²+), cobalto (Co²+), cobre (Cu²+) e zinco (Zn²+) quando expostos a uma concentração de 300 µg mL⁻¹ desses metais. Tais resultados mostram que os fungos do gênero *Mucor* sp. toleram e possuem a capacidade de reter diferentes metais em altas concentrações.

A resistência ao metal cádmio apresentada pelo fungo endofítico *Mucor* sp., pode estar relacionada a formação de espécies reativas de oxigênio e suas enzimas reguladoras, uma vez que esta forma de oxigênio pode ser induzida por meio de exposição a metais pesados. Enzimas, como a SOD e CAT e GR têm sido relatadas por serem ativadas como resultado de níveis elevados de ROS, desta forma em organismos expostos ao estresse causado por metais, essas enzimas são essenciais para a desintoxicação celular, controlando os níveis de radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (LAZAROVA et al., 2014). No presente trabalho pode-se notar que o metal cádmio exerceu diferentes efeitos nessas enzimas, sugerindo que elas sejam responsáveis no endófito *Mucor* sp. por diminuir a concentração de ROS, consequentemente diminuindo o estresse causado por este metal.

A enzima SOD é responsável pela conversão do íon superóxido em peróxido de hidrogênio. Tal enzima tem sido apresentada na maioria dos organismos em diferentes isoformas, as quais são classificadas de acordo com o cofator metálico presente em seu sítio ativo, sendo elas Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Fe-SOD e Ni-SOD (GUELFI et al., 2003; GRATÃO et al., 2005). A avaliação da atividade de SOD analisada por meio de PAGE demonstrou a presença de duas isoformas, sendo elas a Mn-SOD e a Fe-SOD (Figura 9). A síntese da isoforma Fe-SOD cujo papel é a proteção de lipídios e enzimas citoplasmáticas, já foi descrita como constitutiva em bactérias como *E. coli* e *Burkholderia* sp., sendo que ela independe das condições de crescimento do organismo, utilizando outros metais como tratamento (GESLIN et al., 2001; DOURADO et al., 2015), o que pode ser relacionado aos resultados apresentados no presente trabalho, onde *Mucor* sp., tanto para isoforma Fe-SOD quanto a Mn-SOD, demostrou uma produção basal nos controles, sem adição do metal Cd, apresentando uma diferença na intensidade das bandas referentes aos tratamentos apenas na isoforma Fe-SOD.

Diferentemente dos resultados apresentados no presente trabalho, Todorova et al. (2017), em estudos realizados com *Aspergillus niger* crescidos em meio enriquecido com o metal Cd, obtiveram apenas a isoforma Mn-SOD, a qual apresentou uma diferença na intensidade das bandas nas diferentes concentrações do metal.

Em relação à enzima CAT, a qual possui um papel muito importante na manutenção do estado redox da célula, por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio em água (LUNA et al., 2015), em análise por SDS-PAGE, pôde-se observar uma diferença no número de bandas dos controles quando comparados ao tratamento. Além disso, ficou evidente, em análise de atividade feita por espectrofotômetro, uma queda na atividade desta enzima no período de nove dias, seguida de um aumento na atividade no período de 15 dias (Figuras 11 e 12).

Tal queda na atividade da enzima CAT pode estar relacionada com a recuperação do crescimento, o que significa que as células estão saindo do estado de estresse causado pelo H₂O₂ de volta ao crescimento, indicando que elas podem não manter a capacidade de tolerar severamente o estresse, onde a superprodução desta enzima requer um alto consumo de energia, o que corrobora com o fato da queda de atividade da enzimática, a fim de diminuir o desperdício de energia (LI et al., 2008).

Guelfi et al. (2003) testaram a atividade da enzima CAT em *Aspergillus nidulans* crescido em diferentes concentrações do metal cádmio, onde obtiveram um aumento da atividade da enzima em questão, além de apresentar três isoformas da mesma, quando analisados em SDS-PAGE, em todos os tratamentos,
diferenciando-se dos controles, sem adição do metal, apenas na intensidade da banda. Diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, que apresentou um número maior de bandas nos tratamentos, quando comparado aos controles.

O tripeptídeo glutationa (GSH) é um tiol não protéico encontrado em células de animais, plantas e microrganismos, os quais possuem propriedades antioxidantes que protegem as células contra inúmeros elementos, principalmente os metais pesados, formado complexos com esses elementos, o qual foi implicado como um elemento chave nos processos de desintoxicação celular (MAH; JALILEHVAND, 2010).

Os resultados obtidos referentes a ação da glutationa, demostraram um aumento na relação GSH/GSSG nos tratamentos com o metal, indicando que o GSH contribuiu para a eliminação de ROS e a formação de complexos de Cd-GSH, o que foi confirmado por meio da microscopia eletrônica de transmissão, onde ficou evidente a formação de corpos eletrodensos (Figura 16), os quais foram similarmente associados por Xu, X. et al. (2015) em *Penicillium chrysogenum* XJ-1, a formação de complexos Cd-GSH em resposta a diferentes concentrações de Cd.

Tais complexos podem estar relacionados às fitoquelatinas, uma vez que o GSH é essencial para a síntese destes peptidos de ligação de metal, os quais podem inativar e separar metais pesados como Cd, Pb e Hg formando complexos metálicos estáveis intracelularmente (XU, P. et al., 2014).

A relação GSH/GSSG é regulada por uma enzima chamada Glutationa redutase (GR), que faz a redução da glutationa oxidada (GSSG) para a glutationa reduzida (GSH), utilizando NADPH, oxigénio atômico e íons hidroxila, os quais são eliminados pela via glutationa (ERLO, 2006; GAO et al., 2012). Em resposta à exposição a estresses ambientais, principalmente causados por metais, vem sendo relatado um aumento na atividade dessa enzima em diferentes organismos (BLANCH et al., 2013; SEN et al., 2014).

Os dados obtidos por meio do monitoramento da redução de glutationa oxidada, no presente trabalho, confirmam um aumento da atividade da enzima GR nas concentrações de 200 e 400 mg/L, mostrando que nessas concentrações de cádmio, esta enzima pode estar relacionada na manutenção do pool de NADPH, consequentemente agindo na redução de glutationa oxidada (GSSG) para a glutationa reduzida (GSH). Estes resultados estão em conformidade com os apresentados por Yildirim e Asma (2010) que obtiveram um

aumento significativo nas concentrações da enzima GR, com o passar do tempo de tratamento, após 1440 e 2880 minutos, sendo a atividade desta enzima de 170,83 ± 18,547 µmol / min / mg de proteína e 116,99 ±0,284 µmol / min / mg de proteína respectivamente.

Em análise por meio de Microscópio eletrônico de varredura, foi possível notar claramente graves deformações nas células do endófito, as quais tomaram formas esféricas após o tratamento com o metal (Figura 15). Além disso, a análise de EDX demonstrou sinais de cádmio com picos de carbono (Figura 17), em todos os tratamentos com o metal, resultados esses muito similares aos encontrados por Xu, X. et al. (2012), em *Penicillium chrysogenum* XJ-1, que relacionaram essa deformidade morfológica e absorção do metal a parede celular do organismo a mecanismos de troca de íons, os quais podem fazer uso de transportadores de Fe²⁺, Ca²⁺ ou Zn²⁺ para o transporte de cádmio (WU et al., 2011). Desta forma, as análises feitas por microscopia eletrônica e EDX corroboram os resultados obtidos por meio de ICP (Figura 8), em relação a absorção do metal pelo endófito *Mucor* sp.

Estudos tem demonstrado que a fitorremediação aliada a microrganismos endofíticos tem desempenhado um papel importante na descontaminação do meio ambiente, uma vez que estes microrganismos possuem a capacidade de absorver poluentes e promover crescimento em plantas (FENG et al., 2017).

Desta forma foram avaliados a interação entre *Mucor* sp. e planta em relação a fitorremediação, feita por meio de hidroponia com plantas modelo de tomate (*Solanum lycopersicum*), uma vez que o cultivar usado se mostra ultrassensível em relação ao metal cádmio (PIOTTO, 2012).

Os resultados em relação a sintomas de contaminação, impacto sobre as taxas de crescimento e a clorose, não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos - *Mucor* sp. + Cd; e + *Mucor* sp + Cd, exceto em relação ao comprimento de raiz (Figuras 22 e 23).

Por outro lado, as plantas no tratamento + *Mucor* sp + Cd, quando analisadas por ICP, demostraram uma pequena, porém estatísticamente significativa diferença (Tabela 5) no acúmulo do metal cádmio, na parte aérea da planta (caule e folhas), em relação ao tratamento sem a inoculação do endófito (Tabela 5), mostrando que o endófito inoculado pode estar relacionado ao acúmulo do metal na planta, uma vez que os microrganismos podem absorver estes xenobiontes em sua parede celular interferindo na mobilização do metal na planta (XU, X. et al., 2015).

Resultados similares foram apresentados por An et al. (2015) que obtiveram um aumento na concentração de cádmio nas folhas de milho quando inoculadas com o fungo endofítico *Paraphaeosphaeria* sp., o qual foi relacionado ao deslocamento do metal das raízes em sentido as folhas, o que pode também ter acontecido no presente trabalho, uma vez que as concentrações do metal foram menores nas raízes e maiores nas folhas das plantas inoculadas com o endófito, quando comparadas com as não inoculadas.

Pode-se notar uma diferença no crescimento da planta nos tratamentos sem a adição do metal - *Mucor* sp. - Cd; e + *Mucor* sp. - Cd, onde ficou evidente a diferença estatistica significativa no tratamento + *Mucor* sp. - Cd, em relação a todas as variáveis analisadas (Figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24). Tal aumento do crescimento da planta, pode estar ligada a capacidade que os endófitos tem de produzir fito-hormonios, uma vez que endófitos também podem promover o crescimento das plantas por produzirem substâncias como ácido indol acético (DENG; CAO, 2017), o que pôde ser comprovado pelos resultados apresentados em relação a produção de AIA, pelo endófito (CM3) *Mucor* sp., que demonstrou uma produção satisfatória deste ácido quando comparado a outros estudos, como o de Syamsia et al. 2015, que com fungos isolados do arroz obtiveram uma produção que variou entre 0.635 e 2.651 µg/mL.

A presença do endófito nas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Calabash Rouge, na raíz e parte aérea foi confirmada pelo re-isolamento do endófito das plantas inoculadas após o período em hidroponia, atrelando os resultados obtidos a presença do fungo endofítico *Mucor* sp.

6. CONCLUSÃO

O isolado endofítico (CM3) *Mucor* sp. mostrou um potencial biorremediador, podendo ser utilizado como ferramenta para diminuir os danos causados a saúde humana e ao meio ambiente pelos metais pesados, principalmente o metal Cd, além de apresentar uma excelente capacidade de promover o crescimento em plantas. Porém para que seja aplicado como agente biorremediador e promotor de crescimento, novas investigações devem ser feitas para melhor compreensão dos mecanismos utilizados pelo endófito para tais potencias.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.B.; AUDHYA, T.; MCDONOUGH-MEANS, S.; RUBIN, R.A.; QUIG, D.; GEIS, E.; GEHN, E.; LORESTO, M.; MITCHELL, J.; ATWOOD, S.; BARNHOUSE, S.; LEE, W. Effect of a vitamin/mineral supplement on children and adults with autism. **Bmc Pediatrics**, London, v. 11, p. 111-141, 2011.

AHMAD, F.B.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W.O.S.; TE'O, V.S.J.; O'HARA, I.M. Improved microbial oil production from oil palm empty fruit bunch by *Mucor plumbeus*. **Fuel**, London, v. 194, p. 180-187, 2017.

AKHTAR, S.; MAHMOOD-UL-HASSAN, M.; AHMAD, R.; SUTHOR, V.; YASIN, M. Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. **Soil & Environment,** Pakistan, v. 2, n. 32, p. 55-62, 2013.

ALMEIDA, T.T.; ORLANDELLI, R.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Genetics and Molecular Research,** Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 4920-4931, 2015.

ALMEIDA, T.T.; RIBEIRO, M.A.S.; POLON.IO, J.C.; GARCIA, F.P.; NAKAMURA, C.V.; MEURER, E.C.; SARRAGIOTTO, M.H.; BALDOQUI, D.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Curvulin and spirostaphylotrichins R and U from extracts produced by two endophytic *Bipolaris* sp. associated to aquatic macrophytes with antileishmanial activity. **Natural Product Research**, London, p. 1-8, 2017. DOI: 10.1080/14786419.2017.1380011.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

AN, H.; LIU, Y.; ZHAO, X.; HUANG, Q.; YUAN, S.; YANG, X.; DONG, J. Characterization of cadmium-resistant endophytic fungi from *Salix variegata* Franch. in Three Gorges Reservoir Region, China. **Microbiological Research**, Jena, v. 176, p. 29-37, 2015.

ANASONYE, F.; WINQUIST, E.; R€AS€ANEN, M.; KONTRO, J.; J€ORKL€OF, K.; VASILYEVA, G.; JØRGENSEN, K.S.; STEFFEN, K. T.; TUOMELA, M. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, Barking, v. 105, p. 7-12, 2015.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, New York, v. 113, p. 548-555, 1985.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SPASOVA, B.K.; VASSILEV, S.V. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycology Research**, London, v. 109, p. 150-158, 2005.

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLIMSKYSOBRAL, J.; KLEINER-PIZZIRANI, A.A.; AZEVEDO, J.L. (Coord.). **Guia prático**: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2010. 167 p.

ASKER, M.M.S.; MOHAMED, S.F.; MAHMOUD, M.G.; EL SAYED, O.H. Antioxidant and antitumor activity of a new sesquiterpene isolated from Endophytic fungus *Aspergillus glaucus*. International Journal of Pharmtech Research, Mumbai, v. 5, n. 2, p. 391-397, 2013.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Azevedo, J.L.; Serafini, L.A.; Barros, N.M. **Biotecnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Bauru: EDUSC, 2002. cap. 8, p. 235-268.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; PEREIRA, J.O.; ARAUJO, W L. Endophytic microrganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. EJB: **Eletronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagem, v. 104, p. 280-292, 1998.

AZUBUIKE, C.C.; CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C. Bioremediation techniques – classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 32, n. 11, p. 180-198, 2016.

AZZI, V.; KANSO, A.; KAZPARD, V.; KOBEISSI, A.; LARTIGES, B.; EL SAMRANI, A. Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 165, p. 1-10, 2017.

BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; YOUSEFI, P.; MOHAMMADI, J.; BRASK, J. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t - butanol and blue silica gel contents. **Renewable Energy,** Oxford, v. 91, p. 196-206, 2016.

BERNARDI WENZEL, J.; MORESCO, A.A.A.; VILAS BOAS, E.; BURIN, F.A.G.; SOUZA, R.O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Perspectiva Online,** Campos dos Goytacazes, v.9, n. 3, p. 1-15, 2013.

BERNHOFT, R.A. Cadmium toxicity and treatment. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, p. 1-7, 2013.

BESTAWY, E.E.L.; HELMY, S.; HUSSIEN, H.; FAHMY, M.; AMER, R. Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bactéria. **Applied Water Science**, Berlin, v.3, p.181–192, 2013.

BEYRUTH, ZULEIKA. Macrófitas aquáticas de um lago marginal ao rio Embu-mirim, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 272-282, 1993.

BEZZA, F.A.; BEUKES, M.; CHIRWA, E.M. Nkhalambayausi. Application of biosurfactant produced by Ochrobactrum intermedium CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. **Process Biochemistry**, Barking, v. 50, n. 11, p. 1911-1922, 2015.

BLANCH, M.; ROSALES, R.; GOYA, L.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; ESCRIBANO, M.I.; MERODIO, C. NADP-malic enzyme and glutathione reductase contribute to glutathione regeneration in *Fragaria vesca* fruit treated with protective high CO₂ concentrations.**Postharvest Biology and Technolog**, Amsterdam v. 86, p. 431-436, 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, A.K.F.; CONCEIÇÃO, L.R.V.; SILVA, J.P.V.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F. Biodiesel production from *Mucor circinelloides* using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. **Fuel**, London, v. 202, p. 503-511, 2017.

CARVALHO, M.B.; SANDRA T.; MEDEIROS, J.; NUÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; LEITAO, M.C.; GALCERAN, M.T.; HURSTHOUSE, A.; PEREIRA, C.S. Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation—reduction reactions. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 198, p. 133-142, 2011.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Quimica**, Niterói, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHEN, S.H.; NG, S.L.; CHEOW, Y.L.; TING, A.S.L. A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 334, p. 132-141, 2017.

CHU, C.; FENG, Z.; LI, J.; LING, H. Co-overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in *Arabidopsis*-Enhanced Cadmium Tolerance via Increased Cadmium Sequestration in Roots and Improved Iron Homeostasis of Shoots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 790-800, 2011.

COBBETT, C.S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. **Current Opinion in Plant Biology,** Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 211-216, 2000.

CUI, Z.; ZHANGA, X.; YANG, H.; SUNA. L. Bioremediation of heavy metal pollution utilizing composite microbial agent of Mucor circinelloides, *Actinomucor* sp. and Mortierella sp. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 3616-3621, 2017.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S.B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* D.C. (ASTERAECEAE). **Global Science and Technology,** Rio Verde, v. 04, n. 2, p.47-57, 2011.

DAN`J, S.; LI, P.; FRANK, S.; XIONG X. Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by Mucor sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. **Journal of Environmental Sciences**, Ruse, v. 18, n. 6, p. 1204-1209, 2006.

DENG, Z.; CAO, L.; HUANG, H.; JIANG, X.; WANG, W.; SHI, Y.; ZHANG, R. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (Brassica chinensis) in a metal-contaminated soil. **Journal Of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, n. 2-3, p. 717-724, 2011.

DENG, Z.; ZHANG, R.; SHI, Y.; HU, L.; TAN, H.; CAO, L. Enhancement of phytoremediation of Cd- and Pb-contaminated soils by self-fusion of protoplasts from endophytic fungus *Mucor* sp. CBRF59. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 41-47, 2013.

DENG, Z.; CAO, L. Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. **Chemosphere**, Oxford, v. 168, p. 1100-1106, 2017.

DOURADO, M.N.; FRANCO, M.R.; PETERS, L.P.; MARTINS, P.F.; SOUZA, L.A.; PIOTTO, F.A.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes activities of *Burkholderia* spp. strains—oxidative responses to Ni toxicity. **Environmental Science and Pollution Research,** Heidelberg, v. 22, n. 24, p. 19922-19932, 2015.

EBRAHIM, W.; EL-NEKETI, M.; LEWALD, L.; ORFALI, R.S.; LIN, W.; REHBERG, L.; KALSCHEUER, R.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Metabolites from the Fungal Endophyte *Aspergillus austroafricanusin* axenic culture and in fungal-bacterial mixed cultures. **Journal of Natural Products,** Gorakhpur, v. 79, n. 4, p. 914-922, 2016.

ERLO, L.F. **Respostas enzimáticas da linhagem superior CadG1 de Aspergillus sp. A exposição ao Cd**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ESPINOSA-ORTIZ, E.J.; RENE, E.R.; GUYOT, F.; VAN HULLEBUSCH, E.D.; LENS, P.N.L. Biomineralization of tellurium and selenium-tellurium nanoparticles by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. International Biodeterioration & Biodegradation, Barking, v. 124, p. 258-266, 2017.

ESTERHUIZEN-LONDT, M.; SCHWARTZ, K.; PFLUGMACHER, S. Using aquatic fungi for pharmaceutical bioremediation: Uptake of acetaminophen by *Mucor hiemalis* does not result in an enzymatic oxidative stress response. **Fungal Biology,** Amsterdam, v. 120, n. 10, p. 1249-1257, 2016.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de liminologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. v.1, 602 p.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H.A.; HOSSEINI, H.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents.**Methodsx**, Amsterdam, v. 2, p. 72-78, 2015.

FENG, N.X.; YU, J.; ZHAO, H.; CHENG, Y.; MO, C.; CAI, Q.; LI, Y.; LI, H.; WONG, M. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant– endophyte partnerships. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 583, p. 352-368, 2017.

FERREIRA, M.C.; VIEIRA, M.L.A.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA, S.M.F.; ROMANHA, A.J.; GIL, L.H.V.G.; CARVALHO, A.G.O.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 59, p. 36-44, 2015.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, v. 44, p. 59-147, 1975.

GAO, Y.; ZHAO, J.; ZU, Y.; FU, Y.; LIANG, L.; LUO, M.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antioxidant properties, superoxide dismutase and glutathione reductase activities in HepG2 cells with a fungal endophyte producing apigenin from pigeon pea [Cajanus cajan (L.) Millsp.]. **Food Research International**, Ottawa v. 49, n. 1, p. 147-152, 2012.

GARCIA, A.; .RHODEN, S.A.; BERNARDI-WENZEL, J.; ORLANDELLI, R.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Gwalior, India, v. 2, n. 10, p. 35-40, 2012.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Amsterdam, v. 93, p. 34-43, 2013.

GESLIN, C.; LLANOS, J.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. The manganese and iron superoxide dismutases protect Escherichia coli from heavy metal toxicity. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, n. 10, p. 901-905, 2001.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.**Plant Physiology and Biochemistry,** Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Review: making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Funtional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

GUELFI, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; MOLINA, S.M.G. Growth innhibition of the filamentous fungus Aspergillus nidulans by cadmium: and antioxidant enzyme approach. **The Journal of Genetic and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 49, p. 63-73, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.

HUSSAIN[,] H.; KLICHE-SPORY, C.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; ABBAS, G.; GREEN, SCHULZ, B.; KROHN, K.; SHAH[,] A. Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, Haikou, v. 7, p. 224-227, 2014.

IBUOT, A.; DEAN, A.P.; MCINTOSH, O.A.; PITTMAN, J.K.; IBUOT, A.; DEAN, A.P.; MCINTOSH, O.A.; PITTMAN, J.K. Metal bioremediation by CrMTP4 over-expressing Chlamydomonas reinhardtii in comparison to natural wastewater-tolerant microalgae strains. **Algal Research**, Amsterdam, v. 24, p. 89-96, 2017.

JABLONSKA, E.; SOCHA, K.; RESZKA, E.; WIECZOREK, E.; SKOKOWSKI, J.; KALINOWSKI, L.; FENDLER, W.; SEROCZYNSKA, B.; WOZNIAK, M.; BORAWSKA, M.H.; WASOWICZ, W. Cadmium, arsenic, selenium and iron– Implications for tumor progression in breast cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 53, p. 151-157, 2017.

JOSHI, P.K.; SWARUP, A.; MAHESHWARI, S.; KUMAR, R.; SINGH, N. Bioremediation of Heavy Metals in Liquid Media Through Fungi Isolated from Contaminated Sources. **Indian Journal Microbiology**, New Delhi, v. 51, n. 4, p. 482–487, 2011.

JOZEFCZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. **International Journal of Molecular Sciences,** Basel, v. 13, n. 12, p. 3145-3175, 7, 2012.

KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple CAT genes are differentially regulated in *A. nudulans.* **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 1434-1440, 2001.

KHAN, M.A.; KHAN, A.; KHAN, A.; ALAM, M. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 601-602, p. 1591-1605, 2017.

KHAN, Z.; HUSSAIN, S.Z.; REHMAN, A.; ZULFIQAR, S.; SHAKOORI, A.R. Evaluation of cadmium resistant bacterium, *Klebsiella pneumoniae*, isolated from industrial wastewater for its potential use to bioremediate environmental cadmium. **Zoological Society of Pakistan**, Lahore, v. 47, n. 7, p. 1533-1543, 2015.

KHOEI, J.K.; FARMOHAMMADI, S.; NOORI, A.S.; PADASH, A. Bioremediation; a nature-based approach towards having a healthier environment. **Annals of Biological Research**, Udaipur, v. 2, n. 4, p. 43-46, 2013.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura.** Apostila de apoio. Piracicaba: Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica, ESALQ/USP, 1999. 46 p.

KRINGS, M.; TAYLOR, T.N.; DOTZLER, N. Fossil evidence of the zygomycetous fungi. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi,** Utrecht, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2013.

LATINWO, L.M.; DONALD, C.; IKEDIOBI, C.; SILVER, S. Effects of Intracellular Glutathione on Sensitivity of *Escherichia coli* to Mercury and Arsenite. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** New York, v. 242, n. 1, p. 67-70, 1998.

LAZAROVA, N.; KRUMOVA, K.; STEFANOVA, T.; GEORGIEVA, N.; ANGELOVA, M. The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R57 to copper, cadmium and chromium exposure. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, London, v. 28, n. 5, p. 855-862, 2014.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chiling stress induced changes of antioxidants enzymes in the leaves of cucumber. In gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Limerik, v. 159, p. 75-85, 2000.

LI, Q.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. The adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 44, p. 394-402, 2008.

LUNA, M.A.C.; VIEIRA, E.D.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.B.; NASCIMENTO, A.E. Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. **Electronic Journal of Biotechnology,** Valparaiso, v. 18, n. 6, p. 418-427, 2015.

LUO, S.; CHEN, L.; CHEN, J.; XIAO,X.; XU,T.; WAN,Y.; RAO,C.; LIU ,C.; LIU, Y.; LAI, C.; ZENG, C. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. **Chemosphere**, Oxford, v. 85, n. 7, p. 1130-1138, 2011.

MAH, V.; JALILEHVAND, F. Cadmium(II) complex formation with glutathione. **Jbic - Journal of Biological Inorganic Chemistry,** Berlin, v. 15, n. 3, p. 441-458, 2009.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, Amsterdam, v. 30, p. 261-278. 2004.

MARCHUT-MIKOLAJCZYK, O.; KWAPISZ, E.; WIECZOREK, D.; ANTCZAK, T. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 104, p. 142-148, 2015.

MARINHO, A.M.R.; FILHO, E.R.; FERREIRA, A.G.; SANTOS L.S. C25 steroid produced by *Penicillium janthinellum*, a fungus isolated from fruits of *Melia azedarach*. Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo, v. 16, p. 1542-1546, 2005.

MARTINS, D.; COSTA, N.V.; TERRA, M.A.; MARCHI, S.R.; VELINI, E.D. Caracterização química das plantas aquáticas coletadas no reservatório de Salto Grande (Americana-SP). **Planta Daninha,** Viçosa, v. 21, p. 21-25, 2003.

McCORDE, J.M.; FRIDOVICK, I. SOD: an enzimatic function for erytrocuprien (emocuprien). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MÓDENES, A.P.; ESPINOZA QUIÑONES, F.R.; LAVARDA, F.L.; COLOMBO, A.; BORBA, C.E.; LEICHTWEIS, W.A.; MORA, N.D. Removal of heavy metals Cd (II), Cu (II) and Zn (II) biosorption process by using the macrophyte *Eichornia crassipes*. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 66, n. 3, p. 355-362, 2013.

MOHD, S.; SHUKLA, J.; KUSHWAHA, A.S.; MANDRAH, K.; SHANKAR, J.; ARJARIA, N.; SAXENA, P.N.; NARAYAN, R.; ROY, R.K.; KUMAR, M. Endophytic Fungi Piriformospora indica Mediated Protection of Host from Arsenic Toxicity. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 8, p. 1-14, 2017.

MORAIS FILHO, M.C.; CORIOLANO, A.C.F. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **Holos,** Natal, v. 7, p. 133-150, 2016.

MORI, T.; WANG, J.; TANAKAA, Y.; NAGAI, K.; KAWAGISHI, H.; HIRAI, H. Bioremediation of the neonicotinoid insecticide clothianidin by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 321, p. 586-590, 2017.

MUKWEVHO, E.; FERREIRA, Z.; AYELESO, A. Potential role of sulfur-containing antioxidant systems in highly oxidative environments. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 12, p. 19376-19389, 2014.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.B.; PORTO, C.S.; BRANDÃO, M.R.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B,** Amsterdam, v. 1025, p. 16-24, 2016. NETO, P.Q.C. Isolamento e Identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*) e caracterização por marcadores moleculares. 2002. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

NODET, P.; COTON, E.; JANY, J. Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 31, p. 12-32, 2016.

OLIVEIRA, A.P. **Avaliação da influencia dos macronutrientes na bioacumulação do chumbo pela Eichornia crassipes**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.

OLIVERO, J.; SOLANO, B. Mercury in environmental samples from a waterbody contaminated by gold mining in Colombia, South America. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 217, p. 83-89, 1998.

ORLANDELLI, R.C.; ALBERTO, R.N.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. In vitro antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Gwalior, India, v. 2, p. 137-141, 2012.

PAÇO, A.; DUARTE, K.; COSTA, J.P.; SANTOS, P.S.M.; PEREIRA, R.; PEREIRA, M.E.; FREITAS, A.C.; DUARTE, A.C.; ROCHA-SANTOS, T.A.P. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 586, p. 10-15, 2017.

PAMPHILE, J.A. Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.). 1997. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1997.

PAMPHILE, J.A.; ROCHA, C.L.M.S.C.; AZEVEDO, J.L. Co-transformation of a tropical maize endophytic isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gus*A and *nia* genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2004.

PARK, H.; AHN, I.; LEE, J.K.; SHIN, S.C.; LEE, J.; CHOY, E. Molecular cloning, characterization, and the response of manganese superoxide dismutase from the Antarctic bivalve Laternula elliptica to PCB exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 27, n. 3, p. 522-528, 2009.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia**, **Ciência & Desenvolvimento**, Goiania, n. 29, p. 62-76, 2002.

PETRINE, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbyal ecology of leaves.** Heidelberg: Springer, 1991. p. 179-197.

PILEGGI, M.; RAIMAN, M.P.; MICHELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V. Ação Antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale L.* **Publicatio UEPG Biological and Health Sciences,** Ponta Grossa, v. 8, n. 1, p. 47-55, 2002.

PIOTTO, F.A. **Avaliação de tolerância ao cádmio em tomateiro** (*Solanum lycopersicum L.*). 2012. 147 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PODDER, M.S.; MAJUMDER, C.B. Bioremediation of As(III) and As(V) from wastewater using living cells of *Bacillus arsenicus* MTCC 4380. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management,** Amsterdam, v. 8, p. 25-47, 2017.

POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; VITORELLO, V.A.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 548-552, 2008.

PURNOMO, A.S. MORIB, T.; KAMEIC, I.; KONDOB, R. Basic studies and applications on bioremediation of DDT: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 65, n. 7, p. 921-930, 2011.

QADIRA, M.; HUSSAINA, A. Alleviation of heavy metal toxicity and phytostimulation of Brassica campestris L. by endophytic Mucor sp. MHR-7. Ecotoxicology and Environmental Safety, Amsterdam, v. 142, p. 139-149, 2017.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing (Version 3.0. 2). Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014.

RASPANTI, E.; CACCIOLA, S.O.; GOTOR, C.; ROMERO, L.C.; GARCÍA, I. Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in Trichoderma harzianum and in three Fusarium species. **Chemosphere**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 48-54, 2009.

REPO, E.; WARCHOL, J.; BHATNAGAR, A.; SILLAMPA, A. Heavy metals adsorption by novel EDTA-modified chitosan–silica hybrid materials. **Journal of Colloid and Interface Science.** Amsterdam, v. 358, n. 1, p. 261-267, 2011.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**; New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

RHAMANI, A.; MOUSAVI, H.A.; FAZLI, M. Effect of nanostructure alumina on adsorption of heavy metals. **Desalination**, Amsterdam, v. 253, n. 1-3, p. 94-100, 2010.

RHODEN, S.A.; GARCIA, A.; BONGIORNO, V.A.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant Trichilia elegans A. Juss. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Gwalior, India, v. 2, p. 57-59, 2012.

RODRIGO, M.A.M.; CERNEI, N.; KOMINKOVA, M.; ZITKA, O.; BEKLOVA, M.; ZEHNALEK, J.; KIZEK, R.; ADAM, V. Ion exchange chromatography and mass spectrometric methods for analysis of cadmium-phytochelatin (II) complexes. International Journal of Environmental Research and Public Health, Basel, v. 10, n. 4, p. 1304-1311, 2013.

SACKY', J.; LEONHARDT, T.; BOROVIC'KA, J.; GRYNDLER, M.; BRIKSI, A.; KOTRBA, P.Intracellular sequestration of zinc, cadmium and silver in Hebeloma mesophaeum and characterization of its metallothionein genes. **Fungal Genetics and Biology,** Orlando, v. 67, p. 3-14, 2014.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: A continuum of interactins with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics,** Palo Alto, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M.K.H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science,** Taibah, v. 8, n. 2, p. 90-97, 2014.

SAMADI, S.; KARIMI, K.; BEHNAM, S. Simultaneous biosorption and bioethanol production from lead-contaminated media by Mucor indicus. **Biofuel Research Journal**, Ottawa, v. 4, n. 1, p. 545-550, 2017.

SANTAEUFEMIA, S.; TORRES, E.; MERA, R.; ABALDE, J. Bioremediation of oxytetracycline in seawater by living and dead biomass of the microalga Phaeodactylum tricornutum. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 320, p. 315-325, 2016.

SANTIAGO, I.F.; ALVES, T.M.A.; RABELLO, A.; JUNIOR, P.A.S.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia Antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, Berlin, v. 16, p. 95–103, 2012.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.

SEN, G.; ERYILMAZ, I.E.; OZAKCA, D. The effect of aluminium-stress and exogenous spermidine on chlorophyll degradation, glutathione reductase activity and the photosystem II D1 protein gene (psbA) transcript level in lichen *Xanthoria parietina*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 98, p. 54-59, 2014.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 46, p. 209-211, 2005.

84

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Lancaster, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHINE, A.M.; SHAKYA, V.P.; IDNURM, A. Phytochelatin synthase is required for tolerating metal toxicity in a basidiomycete yeast and is a conserved factor involved in metal homeostasis in fungi. **Fungal Biology and Biotechnology Journal**, London, v. 1, n. 2, p. 1-21, 2015.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas,** Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

SOOCH, B.S.; KAULDHAR, B.S.; PURI, M. Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 1429-1447, 2014.

SPROCATI, A. Investigating heavy metals resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandonedmine. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 366, p. 649-658, 2006.

STELLAA, T.; COVINOA, S.; CVANCAROVÁ, M.; FILIPOVÁ, A.; PETRUCCIOLI, M.; ANNIBALE, A.; CAJTHAMLA, T. Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 324, p. 701-710, 2017.

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 3-30.

SYAMSI, A.; KUSWINANTI, T.; SYAM'UM, E.; MASNIAWATI, A. The potency of endophytic fungal isolates collected from local aromatic rice as indole acetic acid (IAA) producer. **Procedia Food Science**, London, v. 3, p. 96-103, 2015.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TEWARI, N.; VASUDEVAN, P.; GUHA, B.K. Study on biosorption of Cr(VI) by *Mucor hiemalis*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2005.

TODOROVA, D.; NEDEVA, D.; ABRASHEV, R.; TSEKOVA, K. Cd (II) stress response during the growth of Aspergillus niger B 77. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 104, p.178-184, 2007.

TRACHSEL, S.; MESSMER, R.; STAMP, P.; HUND, A. Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. **Theoretical And Applied Genetics**, New York, v. 119, n. 8, p.1413-1424, 2009.

TRIPATHI, S.; TRIPATHI, B.D. Efficiency of combined process of ozone and biofiltration in the treatment of secondary effluent. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, p. 6850–6856, 2011.

TURULL, M.; GRMANOVA, G.; DAGO, A.; ARINO, C.; DÍEZ, S.; CRUZ, J.M.D.; ESTEBAN, M. Phytochelatin synthesis in response to Hg uptake in aquatic plants near a chlor-alkali factory. **Chemosphere**, Oxford, v. 176, p. 74-80, 2017.

UQAB, B.; MUDASIR, S.; SHEIKH, A.Q.; NAZIR, R. Bioremediation: A management tool. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, Sunnyvale, v. 7, n. 2, p. 1-5, 2016.

VERMA, J.; BHATT, A.; AGRAWAL, P. In-vitro study on bioaccumulation and tolerance of heavy metals by endophytic fungi *Alternaria alternata* isolated from *Cupressus torulosa*. **Octa Journal of Environmental Research**, Dehradun, India, v. 2, n. 4, p.146-156, 2016.

VIEIRA, L.C.; CORRÊA, E.S.; MORAES, B.S.; ROSSATO, M.V.; VESTENA, S. Toxicidade de cádmio em plantas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental,** Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1574-1588, 2015.

WAQAS, M.; KHAN, L.M.; SHAHZAD, R.; ULLAH, I.; KHAN, A. R.; LEE, I. Muhammad et al. Mutualistic fungal endophytes produce phytohormones and organic acids that promote japonica rice plant growth under prolonged heat stress. **Journal Of Zhejiang University-science B**, Hangzhou, v. 16, n. 12, p.1011-1018, 2015.

WANG, D.; HE, D.; LI, G.; GAO, S.; LV, H.; SHAN, Q.; WANG, L. An efficient tool for random insertional mutagenesis: Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the filamentous fungus Aspergillus terreus. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 98, p. 114-118, 2014.

WANG, L.; JI, B.; HU, Y.; LIU, R.; SUN, W. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. **Chemosphere**, Oxford, v. 184, p.594-600, 2017.

WEBER, R.W.S.; KAPPE, R.; PAULULAT, T.; MOSKER, E.; ANKE, H. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 886-982, 2006.

WEI, Z.; SHAIKH, Z.A. Cadmium stimulates metastasis-associated phenotype in triple-negative breast cancer cells through integrin and β -catenin signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 328, p. 70-80, 2017.

WU, H.; CHEN, C.; DU, J.; LIU, H.; CUI, Y.; ZHANG, Y.; HE, Y.; WANG, Y.; CHU, C.; FENG, Z.; LI, J.; LING, H. Co-Overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in Arabidopsis-Enhanced Cadmium Tolerance via Increased Cadmium Sequestration in Roots and Improved Iron Homeostasis of Shoots. **Plant Physiology,** Rockville, v. 158, n. 2, p. 790-800, 2011.

XU, P.; LIU, L.; ZENG, G.; HUANG, D.; LAI, C.; ZHAO, M.; HUANG, C.; LI, N.; WEI, Z.; WU, H.; ZHANG, H.; LAI, M.; HE, Y. Heavy metal-induced glutathione accumulation and its role in heavy metal detoxification in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 14, p. 6409-6418, 2014.

XU, R.; LI, T.; CUI, H.; WANG, J.; YU, X.; DING, Y.; WANG, C.; YANG, Z.; ZHAO, Z. Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 93, p. 11-18, 2015.

XU, X.; XIA, L.; HUANG, Q.; GU, J.; CHEN, W. Biosorption of cadmium by a metalresistant filamentous fungus isolated from chicken manure compost. **Environmental Technology,** London, v. 33, n. 14, p. 1661-1670, 2012.

XU, X.; XIA, L.; ZHU, W.; ZHANG, Z.; HUANG, Q.; CHEN, W. .Role of Penicillium chrysogenum XJ-1 in the Detoxification and Bioremediation of Cadmium. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-10, 2015.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus Mucor rouxii. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 18, p. 4486-4496, 2003.

YILDIRIM, N.; ASMA, D. Response of antioxidant defence system to cadmiuminduced toxicity in white rot fungus. **Fresenius Environmental Bulletin,** Freising, v. 12, n. 19, p. 3058-3065, 2010.

YOUN, H.D.; KIM, E.J.; ROE, J.H.; HAH, Y.C.; KANG, S.O. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. **Biochemical Journal**, London, v. 96, p. 318-889, 1996.

ZAEFYZADEH, M.R.A.; QULIYEV, S.M.; BABAYEVA, M.A.A. The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces, **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 33, n. 1, p. 1–7, 2009.

ZAHOOR, M.; IRSHAD, M.; RAHMAN, H.; QASIM, M.; AFRIDI, S.G.; QADIR, M.; HUSSAIN, A. Mahwish et al. Alleviation of heavy metal toxicity and phytostimulation of *Brassica campestris* L. by endophytic *Mucor* sp. MHR-7. Ecotoxicology and Environmental Safety, Amsterdam, v. 142, p. 139-149, 2017.

ZHONG, L.-X.; PENG, X.-W.; YANG, D.; SUN. R.-C. Adsorption of Heavy Metals by a Porous Bioadsorbent from Lignocellulosic Biomass Reconstructed in an Ionic Liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 20, p. 5621-5628, 2012.

ZHU, P.; LIAO, L.; ZHAO, T.; MO, X.; CHEN, G.G.; LIU, Z.M. GPER/ERK&AKT/NF-KB pathway is involved in cadmium-induced proliferation, invasion and migration of GPER-positive thyroid cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 442, p. 68-80, 2017.