

**INTERAÇÃO DE PLANTA AQUÁTICA E MICROORGANISMOS PROMOTORES DO
CRESCIMENTO VEGETAL RESISTENTES A COBRE**

LAURA MATHIAS BARROSO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes – RJ

2018

**INTERAÇÃO DE PLANTA AQUÁTICA E MICRORGANISMOS PROMOTORES DO
CRESCIMENTO VEGETAL RESISTENTES A COBRE**

LAURA MATHIAS BARROSO

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Aline Chaves Intorne

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes – RJ

2018

**INTERAÇÃO DE PLANTA AQUÁTICA E MICRORGANISMOS PROMOTORES DO
CRESCIMENTO VEGETAL RESISTENTES A COBRE**

LAURA MATHIAS BARROSO

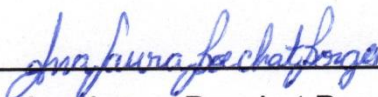
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

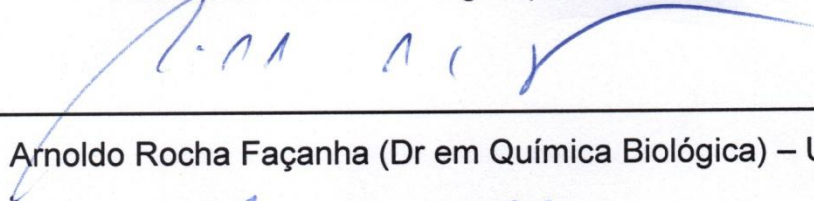
COMISSÃO EXAMINADORA:



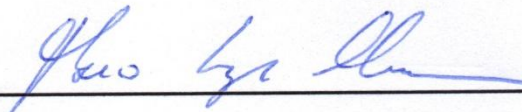
Marcela Bianchessi da Cunha Santino (Dra em Ciências) – UFSCar



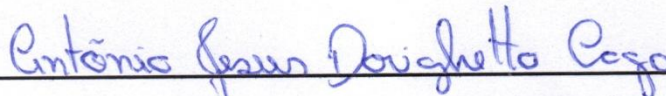
Ana Laura Boechat Borges (Dra em Ciências)



Arnaldo Rocha Façanha (Dr em Química Biológica) – UENF



Fábio Lopes Olivares (Dr em Agronomia – Ciências do Solo) – UENF



Antônio Jesus Dorighetto Cogo (Dr em Biociências e Biotecnologia) – UENF

(Revisor)



Aline Chaves Intorne (Dra em Biociências e Biotecnologia) – UENF

AGRADECIMENTOS

À Dra Aline Chaves Intorne pela orientação e aprendizado;

Aos membros da banca, Dra Marcela Bianchessi da Cunha Santino, Dr Arnoldo Rocha Façanha e Dr Fábio Lopes Olivares pelas contribuições ao trabalho;

Ao Dr Antônio Jesus Doriguetto Cogo pela colaboração e pelo apoio;

À Andresa Lana Thomé Bizzo, Mariana Freitas de Souza e Júlia Ribeiro Soares pela amizade e companheirismo;

Ao grupo de Microbiologia Ambiental e aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos;

A FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia pelo apoio científico e institucional.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos gerais	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REVISÃO	11
3.1 Contaminação do ecossistema aquático por metais	11
3.2 Plantas aquáticas para biorremediação	12
3.3 Interação entre plantas aquáticas e microrganismos benéficos	15
3.4 <i>Yarrowia lipolytica</i>	18
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5 CAPÍTULO 1	29
Caracterização de microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre isolados de <i>Typha domingensis</i>	
Resumo	30
1. Introdução	31
2. Materiais e métodos	32
3. Resultados e discussão	35
4. Conclusão	50
5. Referências Bibliográficas	51
6 CAPÍTULO 2	58
Inoculação de <i>Yarrowia lipolytica</i> promove o crescimento de <i>Salvinia auriculata</i> e reduz estresse causado por cobre	
Resumo	59
1. Introdução	60
2. Materiais e métodos	61
3. Resultados e discussão	64
4. Conclusão	73
5. Referências Bibliográficas	74

RESUMO

Plantas aquáticas são capazes de remover poluentes da água, incluindo metais. Elas ajudam a manter a qualidade do ambiente, atuando ainda como bioindicadoras de poluição em áreas eutrofizadas. *Typha domingensis* e *Salvinia auriculata* tem sido utilizadas para o tratamento de efluentes, e apresentam tolerância ao cobre. Tais características podem estar relacionadas à sua associação com microrganismos benéficos capazes de promover o crescimento vegetal, bem como aumentar a eficiência da remoção de contaminantes na água, auxiliando no processo de biorremediação. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial para a promoção do crescimento vegetal e biorremediação de cobre por microrganismos benéficos associados à *T. domingensis* e *S. auriculata*. No capítulo um, foi realizado o isolamento de 40 microrganismos a partir dos tecidos da folha, rizoma e raiz de *T. domingensis*. Para tanto, foram coletadas plantas adultas em duas lagoas da região Norte Fluminense, uma doce e outra salobra (Campelo e Açú, respectivamente). Os isolados foram caracterizados morfológicamente e identificados através de sequenciamento do gene 16S ribossomal para bactérias e 26S para leveduras. Foram encontradas 21 espécies distintas, em que os gêneros mais representativos foram *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Aeromonas*. Dezenove cepas foram capazes de produzir compostos indólicos, 24 fixaram nitrogênio atmosférico e 31 solubilizaram fosfato inorgânico. A concentração inibitória mínima (CIM) de CuSO_4 foi determinada para todos os microrganismos. A levedura *Yarrowia lipolytica* obtida neste isolamento apresentou CIM de cobre extremamente elevada, superior aos demais isolados: 23 mmol L^{-1} em meio sólido e 10 mmol L^{-1} em meio líquido. Somado a isso, também foi capaz de produzir compostos indólicos e foi a espécie que mais solubilizou fosfato. A partir desses resultados, no segundo capítulo foi avaliado o efeito da inoculação de *Y. lipolytica* em *S. auriculata*, empregada como planta aquática modelo. O resultado mostrou que na presença da levedura houve incremento significativo ($p \leq 0,05$) de peso fresco (11,5%); o peso seco (7,1%); o teor de clorofila a, e carotenóides (20,9; e 15,7%, respectivamente); e conteúdo de nutrientes (22,7% para N, 26,7% para P, 26,7% para S, 29,4% para K, 19,2% para Ca, 28,8% para Mg, 29,5% para Mn, 16,8% para Cu e 19,2% para Zn) na planta após 4 dias de inoculação em casa de vegetação. No experimento de remoção de cobre, a levedura minimizou os efeitos negativos causados pelo metal nas células vegetais após 8 dias de inoculação, observado através do ensaio de extravasamento de eletrólitos. Desta forma, foi possível obter uma levedura candidata a inoculante em sistemas de tratamento de efluentes do tipo *wetland*, utilizando a associação de plantas aquáticas e microrganismos para tornar o processo mais eficiente.

Palavras-chaves: *Typha domingensis*, *Salvinia auriculata*, *Yarrowia lipolytica*, promoção do crescimento vegetal, resistência a metal, biorremediação.

ABSTRACT

Aquatic plants are able to remove pollutants from water, including metals. They help maintain the quality of the environment, and act as bioindicators of pollution in eutrophic areas. *Typha domingensis* and *Salvinia auriculata* are used to treat effluents, and have tolerance to copper. Such characteristics may be related to its association with beneficial microorganisms capable of promoting plant growth, as well as increasing the efficiency of the removal of contaminants in the water, aiding in the bioremediation process. The objective of this work was to evaluate the potential for the promotion of plant growth and copper bioremediation by beneficial microorganisms associated with *T. domingensis* and *S. auriculata*. In first chapter, 40 microorganisms were isolated from leaf, rhizome and root tissues of *T. domingensis*. For this, adult plants were collected in two lagoons of the northern Fluminense region, one freshwater and one brackish (Campelo and Açú, respectively). The isolates were characterized morphologically and identified by sequencing the 16S ribosomal gene for bacteria and 26S for yeast. Twenty one species were found, in which the most representative genera were *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Aeromonas*. Nineteen strains were able to produce indolic compounds, 24 fixed atmospheric nitrogen and 31 solubilized inorganic phosphate. The minimum inhibitory concentration (MIC) of CuSO₄ was determined for all microorganisms. The *Yarrowia lipolytica* yeast obtained in this isolate presented an extremely high copper MIC, superior to the other isolates: 23 mmol L⁻¹ in solid medium and 10 mmol L⁻¹ in liquid medium. In addition, it was also able to produce indole compounds and was the most solubilized phosphate species. From these results, in the second chapter the effect of the inoculation of *Y. lipolytica* on *S. auriculata*, used as a model aquatic plant, was evaluated. The results showed that in the presence of yeast there was a significant increase ($p \leq 0.05$) of fresh weight (11.5%); dry weight (7.1%); the content of chlorophyll a, and carotenoids (20.9 and 15.7%, respectively); and nutrient content (22.7% for N, 26.7% for P, 26.7% for S, 29.4% for K, 19.2% for Ca, 28.8% for Mg, 29.5% for Mn, 16.8% for Cu and 19.2% for Zn) in the plant after 4 days of inoculation in greenhouse. In the copper removal experiment, the yeast minimized the negative effects caused by the metal on plant cells after 8 days of inoculation, observed through the electrolyte extravasation assay. In this way, it was obtained candidate yeast, suitable for an application in wetland effluent treatment systems using the association of aquatic plants and microorganisms to make the process more efficient.

Keywords: *Typha domingensis*, *Salvinia auriculata*, *Yarrowia lipolytica*, plant growth promotion, metal resistance, bioremediation.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a população mundial é de 7,6 bilhões de habitantes. Isso significa que em 50 anos, o número de pessoas no planeta duplicou. Em 2030, estima-se que esse número suba para 8,6 bilhões de pessoas e em 2100 para 11,2 bilhões (ONU, 2017). Em 2017, o Brasil atingiu 207 milhões de habitantes, o que representa um aumento de cerca de 10% em 10 anos (IBGE, 2017). Como consequência, houve um aumento no consumo de bens e serviços, na demanda por alimentos e no uso dos recursos naturais não renováveis (De Moraes et al., 2017). O desenvolvimento acelerado da agricultura e da indústria para atender esse grande número de consumidores causou danos para o ambiente com o despejo de efluentes que contaminaram corpos hídricos (Strungaru et al., 2015; Kupper & Andresen, 2016). Segundo Wetzel (2001), a exploração e degradação acelerada da água doce é um efeito combinado do aumento populacional com a crescente produção e consumo de água para atender os avanços tecnológicos e o desenvolvimento econômico. Esse conceito é denominado “crescimento demotécnico ou demográfico”. Neste sentido, a preocupação de se preservar os mananciais é urgente, assim como a necessidade de práticas conservacionistas de consumo (Abraham & Susan, 2017).

Os metais são uma classe importante de contaminantes que reduzem a qualidade da água. Eles são altamente solúveis e capazes de se acumular ao longo da cadeia trófica, podendo causar problemas à saúde humana, como câncer, doenças cardiovasculares e anemia crônica (Ullah et al., 2015). Apesar de alguns atuarem como micronutrientes (Polishchuk & Polishchuk, 2016), quando em elevada concentração são tóxicos, podendo formar ligações covalentes com carbono. Essas ligações alteram a mobilidade do metal e sua acumulação nas células, modificando o balanço iônico, as cascatas de sinalização e a atividade enzimática (Florea & Busselberg, 2006). Além disso, também podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a degradação de membranas biológicas e a desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos (Yang et al., 2016).

O cobre (Cu) é o terceiro metal mais utilizado no mundo. São inúmeros os produtos a base deste metal (BNDES, 2012). O Brasil é o 15º país na exploração de Cu (IBRAM, 2015). Logo, não só pela mineração, mas também pelo uso, o Cu é um contaminante crítico, podendo causar diversos danos ambientais, sendo necessário buscar alternativas de tratamento (Andreazza et al., 2013).

Alguns métodos físicos e químicos, como precipitação, floculação e troca iônica, já têm sido utilizados para remover excesso de metais na água. No entanto, são métodos de alto custo e em muitos casos não podem ser utilizados para remoção *in situ* (Xie et al., 2013). Por outro lado, técnicas de biorremediação apresentam custo reduzido e podem ser utilizadas diretamente na área contaminada, além de ser um método sustentável que utiliza plantas e microrganismos para retirada de elevados teores de metais (Xie et al., 2013) e outros contaminantes do ambiente. Todavia, embora seja uma tecnologia promissora, seu uso ainda é incipiente (Ali et al., 2013).

Plantas aquáticas como *Typha domingensis* e *Salvinia auriculata* podem ser utilizadas na biorremediação de metais em corpos hídricos, pois apresentam capacidade de tolerar, remover e acumular esses elementos (Üçüncü et al., 2013; Harguinteguy et al., 2015; Jha et al., 2016). Popularmente conhecida como taboa, *T. domingensis* é uma planta aquática emersa que tem sido utilizada no tratamento de efluentes industriais e domésticos, podendo estocar altas concentrações de cromo, níquel, cádmio, zinco, mercúrio e cobre (Adams et al., 2013; Lominchar & Millán, 2015; Mufarrege et al., 2015). Da mesma forma, as plantas flutuantes do gênero *Salvinia* são capazes de bioacumular e remediar cádmio, níquel, chumbo, zinco e cobre (Dhir et al., 2011; Bizzo et al., 2014; Iha & Bianchini, 2015).

A interação de plantas aquáticas com microrganismos benéficos pode favorecer o processo de biorremediação diretamente, pois algumas bactérias e fungos são resistentes a contaminantes, dispondo de mecanismos de captação e detoxificação de metais (Das et al., 2016; Irawati et al., 2016). Como mecanismos indiretos de biorremediação, os microrganismos benéficos também podem promover o crescimento vegetal através da produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio (FBN), e solubilização de fosfato inorgânico, melhorando o estado nutricional das plantas (Glick, 2012; Ghosh et al., 2014; Ndeddy-Aka & Babalola, 2016). Todavia, existem poucos trabalhos mostrando a interação dessas plantas com microrganismos, principalmente, no que tange a promoção do crescimento vegetal e seu uso para biorremediação. Dessa forma, o isolamento, a identificação e a caracterização de microrganismos associados às plantas aquáticas tornam-se interessante para melhor compreender tal relação e contribuir na eficácia dos métodos de biorremediação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial para promoção do crescimento vegetal e biorremediação de cobre por microrganismos benéficos associados à *T. domingensis* e *S. auriculata*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar microrganismos associados a *T. domingensis*;
- Realizar a caracterização morfológica dos microrganismos isolados;
- Identificar as bactérias isoladas através do sequenciamento do gene 16S ribossomal e as leveduras através do gene 26S ribossomal;
- Caracterizar os isolados quanto à capacidade de produzir compostos indólicos, fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de Cu para cada isolado e selecionar um microrganismo promotor do crescimento vegetal resistente ao metal para inoculação na planta;
- Avaliar a promoção de crescimento vegetal após a inoculação do microrganismo selecionado em *S. auriculata* através de medidas de peso, teor de clorofila e determinação de nutrientes;
- Avaliar a fitorremediação de Cu após inoculação do microrganismo selecionado em *S. auriculata* acompanhando peso, teor de clorofila, extravasamento de eletrólitos, determinação de nutrientes e da concentração do metal utilizado como contaminante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação do ecossistema aquático por metais

A manutenção da disponibilidade e da qualidade da água doce são desafios para a humanidade no século XXI. O aumento crescente da contaminação dos corpos hídricos por diversas substâncias, incluindo os metais, representa um risco para o homem e o ecossistema (Harguinteguy et al., 2016). Naturalmente, o ambiente aquático é um reservatório de resíduos lixiviados do solo e de águas subterrâneas. Dessa forma, também se torna reservatório para efluentes e resíduos antrópicos, com destaque para os metais (Islam et al., 2015; Chowdhury et al., 2016).

As principais fontes naturais de metais são a atividade vulcânica, o intemperismo e a erosão de minerais e rochas. As fontes antrópicas incluem as atividades de mineração, indústrias de baterias, fertilizantes e pesticidas, responsáveis pelo aumento da contaminação de metal no ambiente, gerando apreensão devido à toxicidade desses elementos (Sharma et al., 2015; Srivastava et al., 2015). Alguns metais como cobre, zinco e cobalto são considerados micronutrientes essenciais para o funcionamento celular em baixas concentrações. Porém, a acumulação desses elementos nos corpos hídricos pode reduzir a biodiversidade do ambiente aquático, pois diminui a produtividade primária e promove toxidez nos animais, podendo atingir o homem por biomagnificação, ao serem incorporados na cadeia alimentar (Bielmyer-Fraser et al., 2017).

O cobre (Cu) é um metal amplamente empregado em equipamentos eletrônicos, tubos de água, ligas metálicas, como catalisador químico, em tintas anti-incrustantes para cascos de navios e como fungicida agrícola, sendo obtido através da extração mineral (Kumar, 2006). Neste sentido, por conta do uso intenso e potencial de toxicidade, o Cu é classificado como um contaminante prioritário pela *United States Environment Protection Agency* – USEPA, em português, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2014). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA determina que a concentração máxima desse elemento na água doce (Classe 1 e 2) seja de $0,009 \text{ mgL}^{-1}$, segundo a Resolução 357/05 (CONAMA, 2005). No entanto, o efeito do Cu nos seres vivos pode ser deletério mesmo em valores abaixo do estabelecido nessa legislação, dependendo da sua disponibilidade e especiação química (Mackie et al., 2012).

É descrito na literatura que o excesso de Cu pode alterar a transcrição celular, a tradução e a divisão da célula, danificando ácidos nucleicos; desnaturando proteínas; alterando o potencial de oxi-redução; induzindo a formação de EROs; e inibindo a atividade de enzimas relacionadas ao ciclo do carbono e do fósforo (Gaetke & Chow, 2003; Fernández-Calviño et al., 2010; Mackie et al., 2012). Na Figura 1 é apresentado um esquema dos danos celulares causados pelo excesso de Cu, que estão principalmente relacionados ao estresse oxidativo.

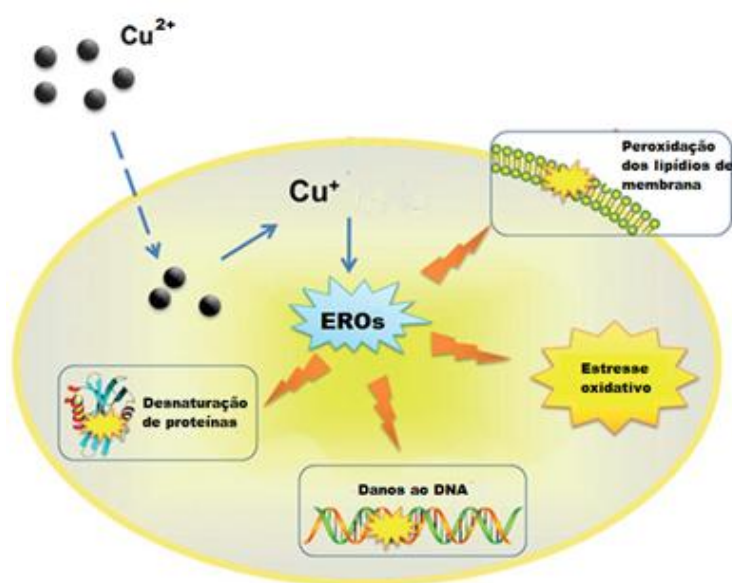


Figura 1: Danos celulares causados pelo excesso de cobre. As EROs geradas pela presença de Cu em excesso causam estresse oxidativo, levando a peroxidação das membranas lipídicas, desnaturação de proteínas e enzimas, afetando vias de sinalização, e danificando a estrutura dos ácidos nucleicos. Adaptado de Li et al. (2013).

Diante do uso excessivo de Cu e a contaminação gerada por este metal, uma alternativa para mitigar seu efeito negativo é a aplicação de plantas aquáticas resistentes a metais, capazes de descontaminar os corpos hídricos. Essas plantas incluem *T. domingensis* e *S. auriculata* (Wolff et al., 2012; Mufarrege et al., 2014).

3.2 Plantas aquáticas para biorremediação

Plantas aquáticas são usualmente chamadas de macrófitas aquáticas. Essa denominação inclui desde macroalgas até angiospermas, que são caracterizadas como vegetais que durante o processo evolutivo retornaram ao ambiente aquático (Esteves, 1998). Em geral, elas são classificadas em cinco grupos de acordo com seu modo de vida na água (Thomaz & Bini, 2003). São eles: i) macrófitas emersas

com folhas e frutos flutuantes (p.ex. *Nymphaea*); ii) macrófitas flutuantes na superfície da água (p.ex. *Salvinia*); iii) macrófitas submersas enraizadas (p.ex. *Egeria*); iv) macrófitas submersas livres (p.ex. *Ceratophyllum*) e v) macrófitas emersas (p.ex. *Typha*)(Figura 2).

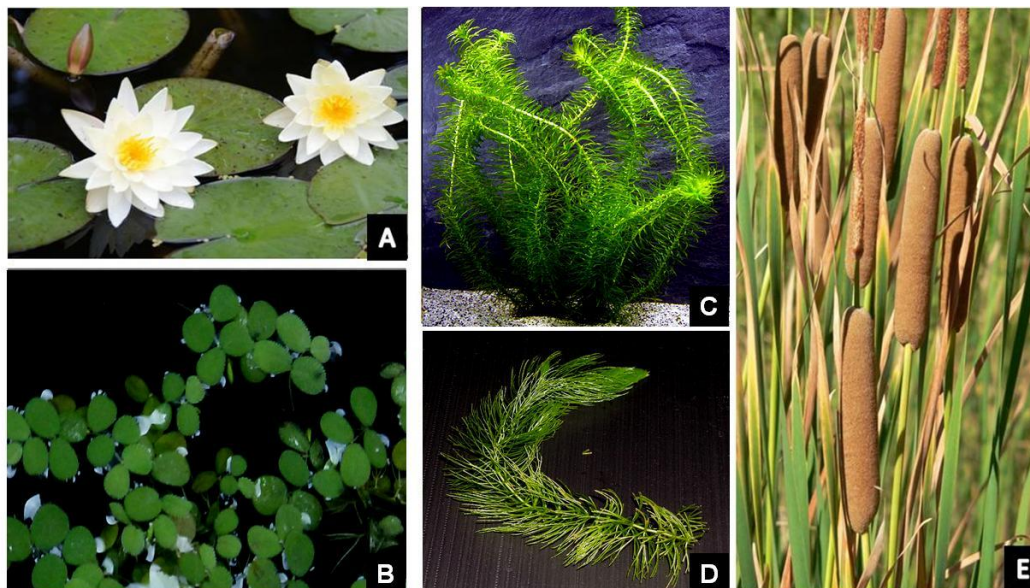


Figura 2: Os cinco grupos de macrófitas aquáticas encontradas nas Américas: A) emersas com folhas e frutos flutuantes – *Nymphaea Alba* (Pezi, 2013); B) flutuantes na superfície da água – *Salvinia auriculata*; C) submersas enraizadas – *Egeria najas* (Maike, 1976); D) submersas livres – *Ceratophyllum demersum* (Tanaka, 2006); E) emersas – *Typha domingensis* (Shebs, 2008).

Diversas famílias de plantas aquáticas habitam um mesmo corpo hídrico, variando a densidade das populações de acordo com as condições ambientais (Thomaz & Bini, 2003). No Brasil, *T. domingensis* e *S. auriculata* são frequentemente encontradas juntas em reservatórios de água doce e bacias hidrográficas (Thomaz et al., 1999; Martins et al., 2008; Bianchini & Cunha-Santino, 2014; Bianchini & Cunha-Santino, 2016).

T. domingensis é uma angiosperma típica de ambientes perturbados com excesso de nutrientes. A planta age removendo esses nutrientes por assimilação, seguida da formação de biomassa vegetal (Pompeo, 2008). Encontrada em ecótonos, *T. domingensis* é tolerante ao aumento de condutividade elétrica, pH e salinidade (Hadad et al., 2006; Mufarrege et al., 2011), apresentando ainda tolerância a cromo, níquel e zinco (Mufarrege et al., 2014).

Conhecida como orelha de onça, *S. auriculata* é uma pteridófita que não possui raízes verdadeiras, apresentando folhas flutuantes fotossintetizantes e folhas

modificadas submersas com função de absorção de nutrientes (Jampeetong & Brix, 2008). Esta planta apresenta alta taxa de crescimento, colonizando rapidamente ambientes com elevada disponibilidade de nutriente (Carvalho, 2015). Similar a *Typha*, *Salvinia* é capaz de remover e acumular metais presentes na água (Tabela 1). *S. auriculata* já foi descrita como resistente a cádmio e cobre (Wolff et al., 2012; Bizzo et al., 2014). Dessa forma, ambas as espécies têm potencial para serem empregadas no tratamento de efluentes industriais, ricos em metais.

Tabela 1: Espécies de *Salvinia* e *Typha* descrita como acumuladoras e tolerantes a metais.

Espécies	Metal	Referências
<i>Salvinia auriculata</i>	Cu, Cd	Wolff et al. (2012); Bizzo et al. (2014)
<i>Salvinia minima</i>	Cd, Ni, Pb e Zn	Estrella-Gómez et al. (2009); Fuentes et al. (2014); Iha & Bianchini (2015); Leal-Alvarado et al. (2016)
<i>Salvinia cucullata</i>	Cu	Das & Goswami (2016b)
<i>Salvinia natans</i>	Cr	Dhir et al. (2011)
<i>Typha domingensis</i>	Hg, Cr, Ni, Zn e Cu	Adams et al. (2013); Lominchar & Millán (2015); Mufarrege et al. (2015)
<i>Typha angustifolia</i>	Fe, Cr e Cd	Ghosh et al. (2014); Duman et al. (2015)
<i>Typha latifolia</i>	Cd, Pb, Cu, Pb, Hg e Zn	Rodriguez-Hernandez et al. (2015); Romero-Hernández et al. (2016)

O uso de plantas para a retirada de contaminantes da água é uma alternativa de biorremediação para o tratamento de ambientes contaminados (Rezania et al., 2016). Biorremediação é o processo que utiliza organismos vivos para remover contaminantes tóxicos ou torná-los menos tóxicos no ambiente, sendo eficaz para remoção de metais. Para tanto, as plantas fitorremediadoras usam mecanismos variados de captação de poluentes orgânicos e inorgânicos, que serão degradados, transformados ou volatilizados (Mani & Kumar, 2014)(Figura 3).

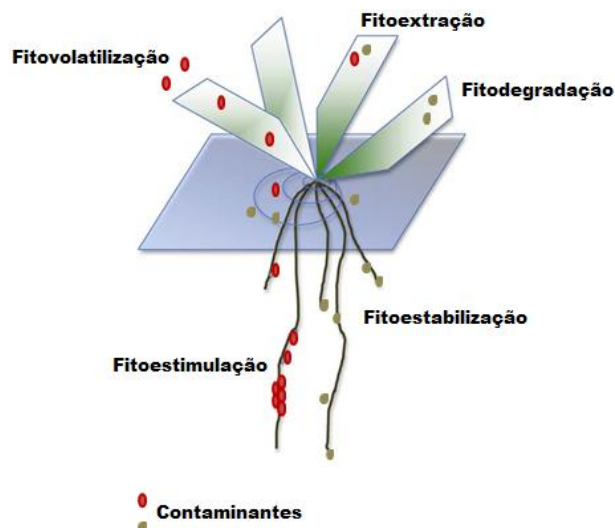


Figura 3: Mecanismos de fitorremediação usados por plantas aquáticas. Adaptado de Stout & Nusslen (2010); Pilon-Smits (2005).

A biorremediação é um método natural, sustentável e de baixo custo com vantagens sobre as abordagens físico-químicas que são frequentemente utilizadas no tratamento de efluentes industriais (Rezania et al., 2016). Essas abordagens físico-químicas incluem técnicas rápidas, como a precipitação química. Todavia, elas são dispendiosas e inadequadas quando comparadas a biorremediação, podendo causar efeitos adversos no ambiente por alterar propriedades físicas, químicas e biológicas (Ullah et al., 2015). Neste sentido, destaca-se que *S. auriculata* é um organismo modelo interessante para estudos de biorremediação com plantas aquáticas, dado o seu tamanho reduzido, fácil amostragem e rápida reprodução (Soares et al., 2008). O genoma de *Salvinia* é pequeno, comparado a outras pteridófitas, o que facilita estudos genéticos no futuro (Machado et al., 2016). Além disso, *S. auriculata* atua como substrato para microrganismos e pequenos invertebrados, viabilizando estudos de interação ecológica (Srivastava et al., 2016).

3.3 Interação entre plantas aquáticas e microrganismos benéficos

A associação entre planta e microrganismo pode promover uma relação benéfica mútua. As plantas fornecem carboidrato e abrigo para os microrganismos, enquanto estes disponibilizam metabólitos que contribuem para o desenvolvimento vegetal. Por isso, tais microrganismos benéficos são conhecidos como promotores do crescimento vegetal (Stout & Nusslem, 2010). A seguir serão apresentadas algumas dessas características microbianas que promovem o crescimento da planta.

A produção de compostos indólicos, incluindo auxinas, por microrganismos influencia a regulação do alongamento, a divisão e a diferenciação celular e a iniciação radicular nos vegetais. O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal auxina produzida por microrganismos, tendo como precursor o L-triptofano (Ludwig-Müller, 2015). Frequentemente, esses organismos associados com plantas produzem compostos indólicos, favorecendo o desenvolvimento vegetal (Hardoim et al., 2008).

Outra característica encontrada em alguns microrganismos associados com plantas é capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. As bactérias diazotróficas possuem genes *nif*, que lhes conferem a capacidade de converter N_2 em NH_3 e NH_4^+ , permitindo que estes elementos sejam assimilados pelos vegetais e utilizados na biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos (Glick, 2012).

Bactérias, fungos e leveduras também são capazes de solubilizar fosfato inorgânico, o segundo nutriente de maior demanda na biomassa vegetal depois do nitrogênio (Oteino et al., 2015). Isto ocorre, principalmente, através da secreção de ácidos orgânicos ou da atividade de fosfatases microbianas, que tornam o fósforo solúvel, pronto para ser absorvido e incorporado na biomassa vegetal (Oteino et al., 2015).

Com tantas características que promovem o crescimento vegetal, as relações benéficas entre plantas e microrganismos são amplamente estudadas no ambiente terrestre, visando à aplicação na agricultura (Nadeem et al., 2014; Xun et al., 2015; Kong & Glick, 2017). Já os estudos no ambiente aquático são escassos. Poucos trabalhos são relatados, especialmente, quando a interação ocorre entre plantas aquáticas e fungos (Ijaz et al., 2016; Srivastava et al., 2016). Na Tabela 2 são listados os trabalhos encontrados.

Tabela 2: Exemplos de interação entre planta aquática e microrganismos benéficos.

Planta	Microrganismo	Aplicação	Referência
<i>Canna indica</i> L.	<i>Funnelliformis mosseae</i>	Redução dos danos de atrazina na planta	Dong et al. (2017)
<i>Phragmites australis</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Fitorremediação de Cd	Huang et al. (2017)
<i>Eichornia crassipes</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	Fitorremediação de Cu	Irawati et al. (2017)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Germinação de sementes, promoção do crescimento vegetal e remoção de Cd, Cr e Ni	Ndeddy Aka & Babalola (2016)
<i>Typha angustifolia</i>	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Bacillus pumilus</i> <i>Planococcus</i> sp. <i>Kocuria rhizophila</i> . <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>	Promoção do crescimento vegetal de arroz	Saha et al. (2016)
<i>Salvinia minima</i>	Bactérias endofíticas associadas a <i>S. minima</i>	Remoção de Cu, Zn, Cr, Ni, Cd e Pb da água	Lindell et al. (2016)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>	Promoção do crescimento vegetal e remoção de Zn	Adediran et al. (2015)
<i>Acorus calamus</i>	Células combustíveis microbianas de sedimento	Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Yan et al. (2015)
<i>Potamogeton crispus</i>	Consórcio microbiano*	Remoção de ácidos ftálicos	Chi & Gao (2015)
<i>Typha domingensis</i>	<i>Microbacterium arborescens</i> <i>Bacillus pumilus</i>	Degradação de efluente têxtil	Shehzadi et al. (2014)
<i>Typha angustifolia</i>	<i>Pseudomonas cookii</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Pseudomonas jaduguda</i>	Promoção do crescimento vegetal	Ghosh et al. (2014)
<i>Phragmites australis</i>	<i>Funnelliformis mosseae</i> <i>Rhizophagus irregularis</i>	Germinação de sementes, aumento da respiração e fotossíntese	Wu et al. (2014)
<i>Typha latifolia</i>	<i>Bacillus endophyticus</i> <i>Paenibacillus macerans</i> <i>Bacillus pumilus</i>	Promoção do crescimento vegetal e fitorremediação de metais (Fe, Cd, Pb, Cr, Ni, Cu e Zn)	Tiwari et al. (2013)

*Microrganismos associados a *P. Crispus* não foram identificados.

No âmbito da biorremediação, os microrganismos têm potencial metabólico versátil e podem favorecer o processo quando utilizados em conjunto com as plantas. Eles subsidiam o aumentam de biomassa vegetal, melhoram o estado nutricional da planta e aumentam a tolerância ao estresse, conseqüentemente,

ampliam a capacidade das plantas fitorremediadoras de remover contaminantes do ambiente (Sessitsch et al., 2013). Isso é relevante, considerando que uma das limitações da biorremediação é demandar mais tempo para remover contaminantes de um mesmo volume, se comparado as técnicas físico-químicas usualmente aplicadas (Zhang et al., 2010). Com a adição do microrganismo, esse processo pode se tornar mais eficiente, acelerando o tratamento da área contaminada.

Na Figura 4, são apresentados mecanismos microbianos para resistir as alterações celulares causadas pelos metais. Pode-se verificar o efluxo de metais, a biossorção, oxi-redução, volatilização, exclusão, remoção ativa, precipitação e bioacumulação extra e intracelular (Gadd, 2010).

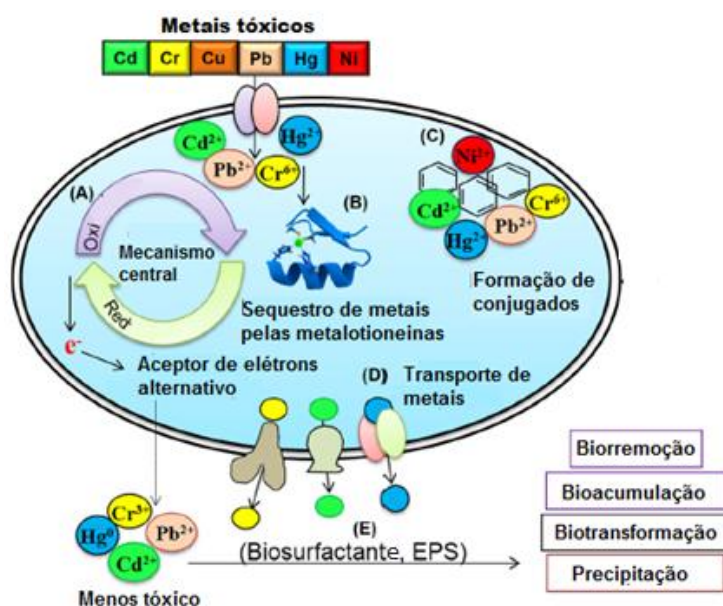


Figura 4: Eventos celulares envolvendo a biorremediação de metais tóxicos. Estes processos incluem: A) reações de oxidação-redução de metais, B) sequestro de metais por metalotioneínas, C) conjugação com compostos orgânicos/precipitação, D) efluxo de metal por transportadores de membrana, e E) biorremediação de metais por produtos microbianos - biosurfactantes ou exopolissacarídeos (EPS), que podem levar a biorremediação, bioacumulação, biotransformação e precipitação. Adaptado de Das et al. (2016).

3.4 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbica, da classe dos Ascomicetos, subclasse *Hemiascomicetos* (Liu et al., 2015). Inicialmente, classificada como *Candida lipolytica* (Wickerman, 1951), apenas nos anos 80 foi conhecida como *Y. lipolytica* por sua preferência em crescer em substratos ricos em lipídeos (Van der Walt et al., 1980).

Largamente distribuída na natureza, *Y. lipolytica* é resistente a altas concentrações de sais e capaz de crescer em uma ampla faixa de pH e temperatura (Fabiszewska et al., 2015). Tem crescimento na forma de células ovais, pseudo-hifas e hifas verdadeiras, sendo um organismo modelo nos estudos de transição dimórfica (Barth & Gaillardin, 1997; Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002; Zhao et al., 2013; Li et al., 2014; Cogo et al., 2018). Tal característica está associada às condições de crescimento (aeração, pH, fonte de carbono, etc.) e seu perfil genético (Sekova et al., 2015).

Y. lipolytica pode crescer em condições extremas, acumulando e utilizando compostos tóxicos (Sekova et al., 2015). Cepas isoladas de diferentes ambientes foram descritas como acumuladoras de metais (Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} e Ni^{2+}) (Strouhal et al., 2003; Bankar et al., 2009b; Shinde et al., 2012). Isso ocorre devido aos múltiplos mecanismos de resistência a estresses utilizados pela levedura, tais como: síntese de melaninas, atividade de Zn-superóxido dismutase (SOD), síntese de metalotioneínas, adsorção de íons metálicos na parede celular e bombas do tipo ATPase para efluxo de metais (Bankar et al., 2009a). Neste sentido, *Y. lipolytica* é um microrganismo promissor nos estudos de biorremediação de água contaminadas (Tabela 3).

Tabela 3: Mecanismos de resistência à contaminantes por *Y. lipolytica*.

Contaminantes	Mecanismos	Referência
Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} Cd^{2+} , Co^{2+} e Cr^{6+}	Biossorção	Strouhal et al. (2003); Ito et al. (2007); Bankar et al. (2009b); Asfaram et al. (2016); Dil et al. (2017); Wierzba (2017)
2,4,6-trinitrotolueno (TNT)	Transformação protéica	Ziganshin et al. (2015); Khilyas et al. (2017);
Bromoalcano	Degradação aeróbica por desalogenação	Vatsal et al. (2015)
Efluente de óleo de palma	Fonte de carbono	Hassanshahian et al. (2012); Louhasakul & Cheirsilp (2013)
Petróleo bruto	Biodegradação	Zinjarde et al. (2014);
Lignocelulose	Fonte de carbono	Tsigie et al. (2011)

Y. lipolytica possui elevado potencial para produção de proteínas heterólogas, lipídeos, ácidos orgânicos, enzimas e outros metabólicos importantes para indústria (Bankar et al., 2009a; Kurtzman, 2011; Gonçalves et al., 2014). Sua atividade lipolítica está associada ao grande número de enzimas do tipo lipase, capazes de

degradar óleos e gorduras, incluindo hidrocarbonetos como o petróleo (Darvishi et al., 2017).

Como observado, a levedura tem um amplo potencial biotecnológico. Todavia, os estudos de interação entre *Y. lipolytica* e plantas ainda são escassos. Vassileva et al. (2000) descreveram uma cepa como solubilizadora de fosfato inorgânico, utilizada como inoculante associada ao fungo micorríza *Glomus deserticola* em tomate. A inoculação dupla em tomate promoveu incremento de biomassa e maior aquisição de fósforo solúvel pelas plantas (Vassilev et al., 2001). Recentemente, a capacidade de produzir auxinas também foi demonstrada *in vitro* para uma outra cepa (Cogo et al., 2018), evidenciando que *Y. lipolytica* realmente pode ser utilizada como inoculante para incremento de biomassa. Apenas um estudo relata o isolamento dessa levedura a partir de planta, a halófita *Atriplex halimus* (Zvyagilskaya et al., 2001). Até o presente, não há relatos de isolamento e interação desse microrganismo com plantas aquáticas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M.R.; SUSAN, T.B. Water contamination with heavy metals and trace elements from Kilembe copper mine and tailing sites in Western Uganda; implications for domestic water quality. *Chemosphere*, v.169, p.281-287, 2017.

ADAMS, A.A. et al. Accumulation of heavy metals by naturally colonizing *Typha domingensis* (Poales: Typhaceae) in waste-rock dump leachate storage ponds in a gold–copper mine in the central tablelands of New South Wales, Australia. *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*, v.27, n.4, p.294-307, 2013.

ADEDIRAN, G.A. et al. Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 490-499, 2015.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M.A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013.

ANDREAZZA, R. et al. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.

ASFARAM, A.; GHAEDI, M.; GHEZELBASH, G.R. Biosorption of Zn²⁺, Ni²⁺ and Co²⁺ from water samples onto *Yarrowia lipolytica* ISF7 using a response surface methodology, and analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *RSC Advances*, v. 6, n. 28, p. 23599-23610, 2016.

BANKAR, A.V.; KUMAR, A.R.; ZINJARDE, S.S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, n. 5, p. 847, 2009a.

BANKAR, A.V.; KUMAR, A.R.; ZINJARDE, S.S. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170, n. 1, p. 487-494, 2009b.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.

BIANCHINI JR.I.; DA CUNHA-SANTINO, M.B. CH₄ and CO₂ from decomposition of *Salvinia auriculata* Aublet, a macrophyte with high invasive potential. *Wetlands*, v.36, n.3, p.557-564, 2016.

BIANCHINI JR.I.; DA CUNHA-SANTINO, M.B. Dynamics of colonization and the collapse of a macrophyte community during the formation of a tropical reservoir. *Fundamental and Applied Limnology/Archivfür Hydrobiologie*, v.184, n.2, p.141-150, 2014.

BIELMYER-FRASER, G.K. et al. Assessment of metal contamination in the biota of four rivers experiencing varying degrees of human impact. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.189, n.1, p.23, 2017.

BIZZO, A.L.T. et al. Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aublet. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v.26, n.3, p.268-277, 2014.

BNDES (2012). Perspectivas atuais da indústria de cobre no Brasil. Disponível em <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1481/1/A%20Set.36_Perspectivas%20atuais%20da%20ind%C3%BAstria%20de%20cobre_P.pdf>. Acesso em 07 de fevereiro de 2018.

CARVALHO, J.C. Efeitos do sombreamento na biomassa, reprodução e anatomia de *Salvinia auriculata* (*Salviniaceae*). Dissertação de mestrado, 2015.

CHI, J.; GAO, J. Effects of *Potamogeton crispus* L.–bacteria interactions on the removal of phthalate acid esters from surface water. *Chemosphere*, v. 119, p. 59-64, 2015.

CHOWDHURY, S. al. Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. *Science of the Total Environment*, v. 569, p. 476-488, 2016.

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

CONAMA (2005) Resolução nº 357/05. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2017.

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

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

DAS, S.; GOSWAMI, S. Copper phytoextraction by *Salvinia cucullata*: biochemical and morphological study. *Environmental Science and Pollution Research*, p.1-9, 2016.

DE MORAES, M.C.P.; DE MELLO, K.; TOPPA, R.H. Protected areas and agricultural expansion: Biodiversity conservation versus economic growth in the Southeast of Brazil. *Journal of Environmental Management*, v.188, p.73-84, 2017.

DHIR, B. et al. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 6, p. 1678-1684, 2011.

DIL, E.A. et al. Highly efficient simultaneous biosorption of Hg²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ by Live yeast *Yarrowia lipolytica* 70562 following response surface methodology optimization: Kinetic and isotherm study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 48, p. 162-172, 2017.

DONG, J. et al. Effects of *Funnelliformis mosseae* inoculation on alleviating atrazine damage in *Canna indica* L. var. flava Roxb. *International Journal of Phytoremediation*, v. 19, n. 1, p. 46-55, 2017.

DUMAN, F.; UREY, E.; KOCA, F.D. Temporal variation of heavy metal accumulation and translocation characteristics of narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, n.22, p.17886-17896, 2015.

EID, E.M. et al. Seasonal courses of nutrients and heavy metals in water, sediment and above-and below-ground *Typha domingensis* biomass in Lake Burullus (Egypt): perspectives for phytoremediation. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v.207, n.11, p.783-794, 2012.

ESTEVEZ, F.A. Fundamentos da Limnologia. Rio de Janeiro: Ed. Interciência/FINEP, 602p, 1998.

ESTRELLA-GÓMEZ, N. et al. The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatins via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology*, v.91, n.4, p.320-328, 2009.

FABISZEWSKA, A.U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1495-1503, 2015.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. Enzyme activities in vineyard soils long-term treated with copper-based fungicides. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, n.12, p.2119-2127, 2010.

FLOREA, A.; BÜSSELBERG, D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals*, v.19, n.4, p.419-427, 2006.

FUENTES, I.I. et al. Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. *Aquatic Toxicology*, v.155, p.142-150, 2014.

GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, v.156, n.3, p.609-643, 2010.

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, v.189, n.1, p.147-163, 2003.

GHOSH, U.D. et al. Root associated iron oxidizing bacteria increase phosphate nutrition and influence root to shoot partitioning of iron in tolerant plant *Typha angustifolia*. *Plant and Soil*, v.381, n.1-2, p.279-295, 2014.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, v.2012, 2012.

GONÇALVES, F.A.G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J.A. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.

HADAD, H.R.; MAINE, M.A.; BONETTO, C.A. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*, v. 63, n. 10, p. 1744-1753, 2006.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, v.16, n.10, p.463-471, 2008.

HARGUINTEGUY, C.A. et al. The macrophytes *Potamogeton pusillus* L. and *Myriophyllum aquaticum* (Vell.)Verdc.as potential bioindicators of a river contaminated by heavy metals. *Microchemical Journal*, v.124, p.228-234, 2016.

HARGUINTEGUY, C.A.; PIGNATA, M.L.; FERNÁNDEZ-CIRELLI, A.N. Lead and zinc accumulation and performance in relation to their use in phytoremediation of macrophytes *Myriophyllum aquaticum* and *Egeria densa*. *Ecological Engineering*, v.82, p.512-516, 2015.

HASSANSHAHIAN, M.; TEBYANIAN, H.; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, n. 7, p. 1386-1391, 2012.

HUANG, X. et al. Adaptive response of arbuscular mycorrhizal symbiosis to accumulation of elements and translocation in *Phragmites australis* affected by cadmium stress. *Journal of Environmental Management*, v. 197, p. 448-455, 2017.

IBGE (2017) Estimativas de população para 1º de julho de 2017. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2100923>>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2018.

IBRAM (2015). Informações sobre a economia mineral brasileira. Disponível em <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00005836.pdf>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2018.

IHA, D.S.; BIANCHINI JR.I. Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. *International Journal of Phytoremediation*, v.17, n.10, p.929-935, 2015.

IJAZ, A. et al. Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant and Soil*, v.405, n.1-2, p.179-195, 2016.

IRAWATI, W. et al. Characterization of heavy metals resistant yeast isolated from activated sludge in Rungkut, Surabaya, Indonesia as biosorbent of mercury, copper, and lead. In: SETYOBUDI, Roy Hendroko; NURINGTYAS, Tri Rini; ADINURANI, Praptiningsih Gamawati (Ed.). AIP Conference Proceedings, 2016.

IRAWATI, W. et al. The Role of heavy metals-resistant bacteria *Acinetobacter* sp. in copper phytoremediation using *Eichhornia crasippes* [(Mart.) Solms]. *KnE Life Sciences*, v. 3, n. 5, p. 208-220, 2017.

ISLAM, M.S. et al. Heavy metal pollution in surface water and sediment: a preliminary assessment of an urban river in a developing country. *Ecological Indicators*, v. 48, p. 282-291, 2015.

ITO, H. et al. Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *Biometals*, v. 20, n. 5, p. 773-780, 2007.

JAMPEETONG, A.; BRIX, H. Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effects of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Aquatic Botany*, v.90, n.1, p.67-73, 2009.

JHA, V.N. et al. Uptake of uranium by aquatic plants growing in fresh water ecosystem around uranium mill tailings pond at Jaduguda, India. *Science of The Total Environment*, v.539, p.175-184, 2016.

KHILYAS, I.V.; LOCHNIT, G.; ILINSKAYA, O.N. Proteomic analysis of 2, 4, 6-trinitrotoluene degrading yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 2600, 2017.

KONG, Z.; GLICK, B.R. The Role of Bacteria in phytoremediation. *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, v.5, 2017.

KUMAR, U. Agricultural products and by-products as a low cost adsorbent for heavy metal removal from water and wastewater: A review. *Scientific Research and Essays*, v.1, n.2, p.033-037, 2006.

KUPPER, H; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, v.8, n.3, p.269-285, 2016.

KURTZMAN, C.P. *Yarrowia van der Walt & von Arx* (1980). *The Yeasts*, v. 5, p. 927-929, 2010.

LEAL-ALVARADO, D.A. et al. Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology*, v.171, p.37-47, 2016.

LI, K.; RAMAKRISHNA, W. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*, v. 189, n. 1, p. 531-539, 2011.

LI, M. et al. Roles of the three Ras proteins in the regulation of dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, v. 14, n. 3, p. 451-463, 2014.

LINDELL, A.H.; TUCKFIELD, R.C.; MCARTHUR, J.V. Differences in the Effect of Coal Pile Runoff (Low pH, High Metal Concentrations) Versus Natural Carolina Bay Water (Low pH, Low Metal Concentrations) on Plant Condition and Associated Bacterial Epiphytes of *Salvinia minima*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 96, n. 5, p. 602-607, 2016.

LIU, H. JI, X.; HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: past, present and future. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1522-1546, 2015.

LOMINCHAR, M.A.; SIERRA, M.J.; MILLÁN, R. Accumulation of mercury in *Typha domingensis* under field conditions. *Chemosphere*, v.119, p.994-999, 2015.

LOUHASAKUL, Y.; CHEIRSILP, B. Industrial waste utilization for low-cost production of raw material oil through microbial fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, n. 1, p. 110-122, 2013.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology*, v.172, p.4-12, 2015.

MACHADO, S.A. et al. Molecular characterization of the species *Salvinia* (Salviniaceae) from the upper Paraná River floodplain. *Genetics and Molecular Research: GMR*, v. 15, n. 3, 2016.

MACKIE, K.A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of copper in vineyards—a mini review. *Environmental Pollution*, v.167, p.16-26, 2012.

MAIKE (1976). Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Egeria_najas_Planchon.jpg> . Acesso em: 9 de janeiro de 2017.

MANI, D.; KUMAR, C. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 11, n. 3, p. 843-872, 2014.

MARTINS, D. et al. Caracterização da comunidade de plantas aquáticas de dezoito reservatórios pertencentes a cinco bacias hidrográficas do estado de São Paulo. *Planta Daninha*, p.17-32, 2008.

MUFARREGE, M.M. et al. Adaptability of *Typha domingensis* to high pH and salinity. *Ecotoxicology*, v.20, n.2, p.457-465, 2011.

MUFARREGE, M.M. et al. Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.105, p.90-96, 2014.

MUFARREGE, M.M. et al. The ability of *Typha domingensis* to accumulate and tolerate high concentrations of Cr, Ni, and Zn. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, n.1, p.286-292, 2015.

NADEEM, S.M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, v.32, n.2, p.429-448, 2014.

NDEDDY AKA, R.J.; BABALOLA, O.O. Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, v.18, n.2, p.200-209, 2016.

ONU (2017) World Population Prospect: The 2017 Revision. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2018.

OTIENO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas isolates*. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.745, 2015.

PEZI (2013). Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nymphaea_alba_flowers_and_leaves_DSC_3997w.jpg>. Acesso em: 9 de janeiro de 2017.

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

POLISHCHUK, E.V.; POLISHCHUK, R.S. The emerging role of lysosomes in copper homeostasis. *Metallomics*, v.8, n.9, p.853-862, 2016.

POMPÊO, Marcelo. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.3, p.5, 2008.

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

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M.C. et al. Increased accumulation of cadmium and lead under Ca and Fe deficiency in *Typha latifolia*: A study of two pore channel (TPC1) gene responses. *Environmental and Experimental Botany*, v.115, p.38-48, 2015.

ROMERO-HERNÁNDEZ, J.A. et al. Tolerance and hyperaccumulation of a mixture of heavy metals (Cu, Pb, Hg, and Zn) by four aquatic macrophytes. *International Journal of Phytoremediation*, v.19, n.3, p.239-245, 2017.

RUIZ-HERRERA, J.; SENTANDREU, R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, v. 178, n. 6, p. 477-483, 2002.

SAHA, C. et al. A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. *Plant Biology*, v. 18, n. 6, p. 938-946, 2016.

SEKOVA, V.Y. et al. Redox status of extremophilic yeast *Yarrowia lipolytica* during adaptation to pH-stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 51, n. 6, p. 649-654, 2015.

SESSITSCH, A. et al. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.60, p.182-194, 2013.

SHARMA, S.; SINGH, B.; MANCHANDA, V.K. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, n.2, p.946-962, 2015.

SHEBS (2008). Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Typha_domingensis_5.jpg>. Acesso em: 9 de janeiro de 2017.

SHEHZADI, M. et al. Enhanced degradation of textile effluent in constructed wetland system using *Typha domingensis* and textile effluent-degrading endophytic bacteria. *Water Research*, v.58, p.152-159, 2014.

SHINDE, N.R. et al. Removal of Ni (II) ions from aqueous solutions by biosorption onto two strains of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Environmental Management*, v. 102, p. 115-124, 2012.

SOARES, D.C.F. et al. *Salvinia auriculata*: Aquatic bioindicator studied by instrumental neutron activation analysis (INAA). *Applied Radiation and Isotopes*, v.66, n.5, p.561-564, 2008.

SRIVASTAVA, J.K. et al. Plant-microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: a review. *Applied Water Science*, p.1-12, 2016.

SRIVASTAVA, S.; AGRAWAL, S.B.; MONDAL, M.K. A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, n.20, p.15386-15415, 2015.

STOUT, L.; NÜSSLEIN, K. Biotechnological potential of aquatic plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, v.21, n.3, p.339-345, 2010.

STROUHAL, M. et al. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry*, v. 60, n. 1, p. 29-36, 2003.

STRUNGARU, S. et al. Influence of urban activity in modifying water parameters, concentration and uptake of heavy metals in *Typha latifolia* L. into a river

that crosses an industrial city. Journal of Environmental Health Science and Engineering, v.13, n.1, p.5, 2015.

TANAKA (2006). Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ceratophyllum_demersum_var.demersum.JPG>. Acesso em: 9 de janeiro de 2017.

THOMAZ, S.M. et al. Aquatic macrophytes of Itaipu Reservoir, Brazil: survey of species and ecological considerations. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.42, n.1, 1999.

THOMAZ, S.M.; BINI, L.M. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Eduem, 2003.

TIWARI, S.; SINGH, S.N.; GARG, S.K. Induced phytoremediation of metals from fly ash mediated by plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Environmental Biology, v. 34, n. 4, p. 717, 2013.

TSIGIE, Y.A. et al. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource Technology, v. 102, n. 19, p. 9216-9222, 2011.

ÜÇÜNCÜ, E. et al. Decrease and increase profile of Cu, Cr and Pb during stable phase of removal by duckweed (*Lemna minor* L.). International Journal of Phytoremediation, v.15, n.4, p.376-384, 2013.

ULLAH, A. et al. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. Environmental and Experimental Botany, v.117, p.28-40, 2015.

USEPA (2014) Protection of Environment, Appendix A to 40 CFR, Part 423 - 126 Priority Pollutants. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2017.

VAN DER WALT, J.P.; VON ARX, J.A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. Antonie van Leeuwenhoek, v. 46, n. 6, p. 517-521, 1980.

VASSILEV, N. et al. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. Journal of Biotechnology, v. 91, n. 2-3, p. 237-242, 2001.

VASSILEVA, M. et al. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, v. 35, n. 7, p. 693-697, 2000.

VATSAL, A.; ZINJARDE, S.S.; KUMAR, A.R. *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, a tropical marine yeast, degrades bromoalkanes by an initial hydrolytic dehalogenation step. Biodegradation, v. 26, n. 2, p. 127-138, 2015.

WICKERMAN L.J. "Taxonomy of yeasts", US Department of Agriculture Technical Bulletin, No. 1029, Washington, pp. 1-56, 1951.

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

WOLFF, G. et al. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. Brazilian Journal of Biology, v.72, n.1, p.71-77, 2012.

WU, J. et al. Seedling performance of *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Applied Microbiology, v. 116, n. 6, p. 1593-1606, 2014.

XIE, W. et al. Cadmium accumulation in the rootless macrophyte *Wolffia globosa* and its potential for phytoremediation. International Journal of Phytoremediation, v.15, n.4, p.385-397, 2013.

XUN, F. et al. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, n.1, p.598-608, 2015.

YAN, Z. et al. Complex interactions between the macrophyte *Acorus calamus* and microbial fuel cells during pyrene and benzo [a] pyrene degradation in sediments. *Scientific Reports*, v. 5, 2015.

YANG, Y. et al. Interactive zinc, iron, and copper-induced phytotoxicity in wheat roots. *Environmental Science and Pollution Research*, v.24, n.1, p.395-404, 2017.

ZHANG, B.Y.; ZHENG, J.S.; SHARP, R.G. Phytoremediation in engineered wetlands: mechanisms and applications. *Procedia Environmental Sciences*, v. 2, p. 1315-1325, 2010.

ZHAO, X.F. et al. The TEA/ATTS transcription factor YITec1p represses the yeast-to-hypha transition in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, v. 13, n. 1, p. 50-61, 2013.

ZIGANSHIN, A.M. et al. Fe (III) mineral reduction followed by partial dissolution and reactive oxygen species generation during 2, 4, 6-trinitrotoluene transformation by the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express*, v. 5, n. 1, p. 8, 2015.

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

ZVYAGILSKAYA, R. et al. Isolation and characterization of a novel leaf-inhabiting osmo-, salt-, and alkali-tolerant *Yarrowia lipolytica* yeast strain. *Journal of Basic Microbiology*, v. 41, n. 5, p. 289-303, 2001.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL RESISTENTES A COBRE ISOLADOS DE *Typha* *domingensis*

RESUMO

O cobre (Cu) é um contaminante prioritário devido ao seu uso intenso e potencial toxicidade aos seres vivos. Técnicas como a biorremediação podem ser utilizadas para o tratamento de áreas contaminadas pelo metal, utilizando organismos vivos. *Typha domingensis* é uma planta aquática com potencial fitorremediador capaz de tolerar e acumular altas concentrações de Cr, Ni, Zn, Hg, Cu e Mn. Sua associação com microrganismos benéficos pode promover o aumento da biomassa vegetal e favorecer a fitorremediação. Todavia, poucos estudos descrevem a microbiota associada com essas plantas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi isolar, identificar e caracterizar microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a cobre a partir de *T. Domingensis* de lagoas do Norte Fluminense. Foram isolados 40 microrganismos associados a essa planta aquática, e identificados por sequenciamento dos genes 16S e 26S rRNA. Foram encontradas 22 Gamaproteobactérias, 8 Firmicutes, 2 leveduras do filo Ascomycetes e 8 bactérias não identificadas. Entre as cepas, 19 produziram compostos indólicos, 24 bactérias fixaram nitrogênio atmosférico e 31 solubilizaram fosfato. A levedura *Yarrowia lipolytica* produziu compostos indólicos e foi a espécie que mais solubilizou fosfato. A concentração inibitória mínima (CIM) de CuSO_4 foi determinada para todos os microrganismos. As bactérias mais resistentes pertencem ao gênero *Serratia*, com CIM de 9 e 11 mmol L^{-1} . Entretanto, as cepas de *Y. lipolytica* apresentaram a CIM mais elevada, 23 mmol L^{-1} em meio sólido e 10 mmol L^{-1} em meio líquido. Foi observado que o elevado perfil de resistência dessa levedura está relacionado a alterações morfológicas no tamanho e no aspecto da colônia, bem como a produção de pigmento de cor marrom claro, semelhante à melanina. O Cu também provocou alterações morfológicas nas células do centro e da borda da colônia. Foram encontradas pseudo-hifas, células aberrantes em tamanho, e células com aspecto escuro e granuloso nas maiores concentrações utilizadas. Essas modificações estruturais podem atuar como mecanismos de defesa ao estresse causado pelo metal e tornam *Y. lipolytica* um organismo candidato a ensaios de interação com plantas aquáticas, visando ganho de biomassa e remoção de Cu de corpos hídricos.

Palavras-chaves: Fitorremediação, plantas aquáticas, interação planta e microrganismos, *Yarrowia lipolytica*

1 Introdução

A crise hídrica global é um dos problemas mais graves que a humanidade enfrenta hoje. A demanda por água é crescente, não apenas para consumo humano, mas também para atender às necessidades da indústria e agricultura. Além disso, a escassez de água é acompanhada da contaminação dos corpos hídricos por substâncias que representam risco para o homem e o ecossistema (Strungaru et al., 2015; Harguinteguy et al., 2016). Estes resíduos podem ser oriundos da lixiviação do solo, de águas subterrâneas, de efluentes domésticos e industriais, de vazamentos de petróleo e despejos de minas e poços (Kupper & Andresen, 2016; Ryciewicz-Borecki et al., 2016). Neste sentido, os metais representam um grupo de contaminantes críticos, pois estes elementos não são degradados e se acumulam ao longo da cadeia trófica pelo processo de biomagnificação (Bielmyer-Fraser et al., 2017).

O cobre (Cu) é classificado como um contaminante prioritário devido ao seu uso intenso e potencial toxicidade aos seres vivos (USEPA, 2014). Obtido através da extração mineral, o Cu é empregado em equipamentos eletrônicos, tubos de água, ligas metálicas, como catalisador químico, em tintas anti-incrustantes para cascos de navios e como fungicida agrícola (Kumar, 2006). Nos seres vivos, o Cu atua como micronutriente, sendo cofator de enzimas, como a citocromo c oxidase, a Cu,Zn-superóxido dismutase e as ATPases (Gaetke & Chow, 2003). Contudo, quando em excesso, este metal pode conduzir ao desequilíbrio iônico alterando o potencial de oxi-redução, afetando a transcrição, a tradução e a divisão celular e induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gaetke & Chow, 2003; Fernández-Calviño et al., 2010; Li et al., 2011; Mackie et al., 2012).

Técnicas convencionais para remoção de íons metálicos da água podem não ser satisfatórias, pois apresentam elevados custos econômicos, produzem lodo secundário e gastam muita energia (Yaro et al., 2015). Por outro lado, técnicas como a biorremediação são sustentáveis e apresentam custo reduzido, utilizando organismos vivos para o tratamento de áreas degradadas (Xie et al., 2013). Plantas utilizadas nesse processo devem apresentar rápido crescimento, ser de fácil cultivo, tolerantes a contaminantes e capazes de acumulá-los em seus tecidos (Ijaz et al., 2016). Por isso, as plantas aquáticas são consideradas o principal componente biológico deste método (Hadad et al., 2006; Pang et al., 2016).

Typha domingensis é uma planta aquática emersa naturalmente encontrada em regiões alagadas chamadas de *wetlands* (Junk et al., 2014). Com a ação antropogênica, também é muito encontrada em ambientes perturbados com elevadas concentrações de nutrientes (Miao and Sklar, 1998). Conhecida como taboa, é capaz de tolerar e acumular altas concentrações de Cr, Ni, Zn, Hg, Cu e Mn (Adams et al., 2013; Lominchar & Millán, 2015; Mufarrege et al., 2015). Somado a isso, é capaz de se crescer em condições de elevado pH e alta salinidade, sem restringir a absorção de outros nutrientes (Mufarrege et al., 2011). Dessa forma, *T. domingensis* tem sido proposta para emprego no tratamento de efluentes industriais (Hadad et al., 2006, Shehzadi et al., 2014, Ijaz et al., 2016).

Outro componente biológico, ainda pouco estudado nos processos de biorremediação, são os microrganismos (Stout & Nusslen, 2010; Srivastava et al., 2016). Estes seres vivos apresentam potencial metabólico versátil adaptado a condições extremas, o que pode ajudar as plantas aquáticas a sobreviverem condições de estresse (Gadd, 2010; Dey et al., 2016). Além disso, bactérias e fungos podem promover o crescimento de plantas, aumentando a biomassa vegetal e melhorando o estado nutricional, consequentemente, aumentando a ação fitorremediadoras mesmas (Sessitsch et al., 2013). Os principais mecanismos de promoção do crescimento vegetal por microrganismos são: i) a produção de fitormônios como o ácido indol-3-acético, ii) a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, iii) a solubilização de minerais como fósforo, iv) e a resistência a estresses (Spaepen & Vanderleyden, 2011; Rajkumar et al., 2012; Baldani et al., 2014; Santoyo et al., 2016).

Por isso, os objetivos do presente estudo foram isolar e identificar microrganismos associados a *T. domingensis* obtidas de duas diferentes lagoas, a fim de obter cepas com potencial biotecnológico para promover o crescimento vegetal e resistir a cobre.

2 Materiais e métodos

2.1 Área de estudo

Dois lagoas costeiras da região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram selecionadas para coleta de material biológico devido à ocorrência da planta *T. domingensis* nessas áreas. A lagoa do Campelo está localizada entre os

municípios de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana. Sua água doce é utilizada para irrigação e abastecimento da comunidade local (Da Conceição Gomes & Suzuki, 2014). A lagoa do Açú está situada entre os municípios de São João da Barra e Campos dos Goytacazes. Sua água é salobra, e tem parte de sua bacia usada para pastagem, lavoura de subsistência e pesca (Santos et al., 2015).

Nas lagoas foram coletadas plantas adultas de *T. domingensis* com 1,50 m de altura em média, com folhas verdes, sem flores e sem sinal de necrose. A coleta foi realizada em triplicata no período da manhã. O pH, a condutividade elétrica e a temperatura das lagoas foram avaliados através de equipamento portátil multiparâmetros (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das lagoas durante a coleta de *T. domingensis*.

	Coordenadas	Data da coleta	pH	CE ^a	Temperatura ^b
Lagoa do Campelo	21°39'S 41°11'W	17/07/2014	8,8	1583 uS/cm	25,3 °C
Lagoa do Açú	21°55'S 40°59'W	04/08/2014	7,3	9160 uS/cm	24,5 °C

^aCondutividade elétrica, ^bTemperatura da água.

2.2 Isolamento e cultivo de microrganismos

No laboratório, amostras de 0,5 g de tecido vegetal, das folhas, raízes e rizomas foram lavadas com água destilada e incubadas em 10 mL de solução salina 0,85% NaCl por 10 min em ultrassom. Em seguida, as plantas foram maceradas nesta mesma solução, diluídas a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e plaqueadas em triplicata nos meios DIGS (Döbereiner et al., 1999) e NYDA (Pusey & Wilson, 1988). As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após o crescimento das culturas, os microrganismos foram isolados com base nas diferenças morfológicas das colônias. O cultivo para manutenção dos isolados foi realizado em meio DIGS líquido, a 30 °C em agitador orbital a 175 rpm por 16 h.

2.3 Identificação molecular das cepas isoladas

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit *Plant DNAzol* (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). A PCR continha 1µL de DNA, 10 µM de cada iniciador, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 2,5 µL de tampão, 2,5 U de Taq polimerase. Os iniciadores para o gene *16S rRNA* foram 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1429R (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') (Weisburg et al., 1991). As condições de amplificação foram: 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C

por 30 s e 72 °C por 2 min, e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os iniciadores para o gene 26S *rRNA* foram NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman & Robnett, 1997). O programa utilizado foi 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 61,5 °C por 30s e 72 °C por 45 s e uma extensão final de 72 °C por 10 min. O sequenciamento foi realizado pela Ludwing Biotec – ACTGene Serviço de seqüenciamento (Rio Grande do Sul, Brasil). A análise e edição das sequências foi realizada no programa BioEdit 7.0, o alinhamento das sequências consenso foi realizado com Clustal W (Thompson et al., 1997) e BLAST *nucleotides* contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

2.4 Caracterização das bactérias e leveduras

Inicialmente, para critério de classificação dos microrganismos e observação da forma da célula no microscópio óptico, foi realizado teste de Gram (Pelczar et al., 1993). Em seguida, foram analisadas características de promoção do crescimento vegetal descritas abaixo.

A produção de compostos indólicos, incluindo auxinas, foi verificada pelo método de Salkowsky em microplaca (Sarwar & Kremer, 1995). Os isolados foram cultivados em meio DIGS, com e sem adição de triptofano (100 µg L⁻¹) e incubadas no escuro por 72 h sob agitação. O sobrenadante foi transferido para microplaca de 96 poços, adicionando-se reagente de Salkowsky (1 mL de FeCl₃.6H₂O 0,5 mol L⁻¹ em 49 mL de HClO₄ 35% em água) na proporção de 1:1, seguido de incubação no escuro por 30 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 544 nm utilizando-se ácido indol-3-acético (AIA) como padrão.

A capacidade diazotrófica foi testada após a lavagem das bactérias em solução salina (NaCl 0,85%) para remoção do meio de cultivo. Então, 20 µL da cultura foram inoculadas nos meios semi-sólidos isentos de nitrogênio NFb, JNFb e JMV (Baldani et al., 2014). Após 7 dias foi verificada a presença ou ausência da película aerotóxica. Para validação do resultado, as culturas foram repicadas três vezes nestes meios isentos de N.

A solubilização de fosfato foi avaliada em meio sólido Basal, acrescido de 0,8 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂, e incubado durante 5 dias para a observação do halo de

solubilização. O índice de solubilização (IS) foi calculado segundo a fórmula: $IS = \text{halo de solubilização} - \text{tamanho da colônia (cm)}$ (Verma et al., 2001).

2.5 Ensaio de concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM), definida com a menor concentração de uma substância capaz de inibir o crescimento de um organismo (Wiegand et al., 2008), foi utilizada para avaliar a resistência das cepas isoladas a Cu. Uma alíquota de 10 μL da cultura foi depositada sobre o meio DIGS sólido contendo concentrações crescentes de CuSO_4 (1 a 23 mmol L^{-1}). As placas foram incubadas por 5 dias. O isolado mais resistente também foi cultivado em meio DIGS líquido contendo 1,0; 5,0; 7,5 e 10,0 mmol L^{-1} de CuSO_4 , sob agitação constante por 24, 48 e 72 h. Ao final do experimento, as células foram observadas em microscópio óptico para verificar possíveis alterações morfológicas.

2.6 Análise estatística

Os dados do CIM líquido foram realizados em três experimentos independentes e a análise estatística avaliada por Two-way ANOVA ($p \leq 0,01$), utilizando GraphPad Prism versão 5.0.

3 Resultados e discussão

3.1 Microrganismos associados à *Typha domingensis*

Poucos estudos, do nosso conhecimento, são destinados à identificação de microrganismos cultiváveis isolados de plantas aquáticas (Tiwari et al., 2013; Ghosh et al., 2014; Wu et al., 2014; Adediran et al., 2015; Ndeddy Aka & Babalola, 2016; Saha et al., 2016). Nós isolamos 40 cepas a partir de folhas, raízes e rizomas de *T. domingensis* (Tabela 2). A maior proporção de microrganismos, 62,5% (25 isolados), foi oriunda de plantas coletadas na Lagoa do Campelo, distribuída entre bactérias Gram negativas e positivas, e duas leveduras da mesma espécie. Na lagoa do Açú foram obtidas 15 bactérias, das quais 73,3% são bacilos Gram negativos (Tabela 2). Apesar do menor número de cepas obtidas nesta lagoa, o ecossistema apresentou uma grande variedade de espécies identificadas. Sedimentos de corpos hídricos com elevadas concentrações de sais possuem uma microbiota diversa, em constante competição. Esses microrganismos apresentam mecanismos de

adaptação a tais condições (Zeram, 1997; Foti et al., 2007; Ma et al., 2010). Como *T. domingensis* é uma planta aquática enraizada, as bactérias presentes no substrato também estão em contato com suas raízes e podem se espalhar pela planta, o que explica o maior número de espécies isoladas nessa planta a partir da Lagoa do Açú.

As análises do sequenciamento mostraram que entre os 32 microrganismos identificados, 68,8% são Gamaproteobactérias, 25% são Firmicutes e 6,3% são leveduras do filo Ascomiceto. Entre as cepas classificadas como Gamaproteobactérias, o gênero mais representativo foi *Pseudomonas* (36,7%) e *Aeromonas* (18,9%). *Bacillus* foi o gênero mais representativo entre as bactérias Firmicutes (75%)(Tabela 2).

Tabela 2: Identificação e caracterização dos microrganismos isolados de *T. domingensis*.

Cepa	Tecido vegetal	Grupo taxonômico	Espécie isolada	Identidade	Acesso NCBI	Gram	Forma
<i>Lagoa do Campelo</i>							
4.1.5.0.X-A	Folha	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	98%	KR780462.1	+	bacilos
4.1.5.0.X-B	Raiz	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	98%	EU834245.1	+	bacilos
4.1.5.0.X-C	Folha	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	98%	EF428235.2	+	bacilos
4.1.5.0.X-D	Rizoma	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	98%	KJ534499.1	+	bacilos
4.1.5.1.X-A	Folha	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	LC208134.1	+	bacilos
4.2.5.0.X-A	Rizoma	Proteobacteria	<i>Enterobacter asburiae</i>	98%	KC759400.1	-	bacilos
4.2.5.0.X-B	Folha	Proteobacteria	<i>Enterobacter asburiae</i>	97%	KX301285.1	-	bacilos
4.2.5.0.X-C	Folha	Proteobacteria	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98%	GQ496663.1	-	bacilos
4.2.5.2.X-A	Raiz	Proteobacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97%	MF767576.1	-	bacilos
4.2.5.4.X-A	Rizoma	Proteobacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97%	MF767585.1	-	bacilos
4.1.5.0.X-E	Rizoma	Proteobacteria	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	98%	KY928092.1	-	bacilos
4.1.5.0.X-F	Raiz	Proteobacteria	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	97%	EU082832.1	-	bacilos
4.2.5.2.X-B	Raiz	Proteobacteria	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	97%	CP012555.1	-	bacilos
4.2.5.0.X-D	Folha	Proteobacteria	<i>Serratia marcescens</i>	98%	KF700093.1	-	bacilos
4.2.5.2.X-C	Raiz	Proteobacteria	<i>Serratia marcescens</i>	97%	MF620086.1	-	bacilos
4.1.5.0.X-G	Rizoma	Proteobacteria	<i>Serratia</i> sp.	96%	KY790421.1	-	bacilos
4.2.5.0.X-E	Raiz	Ascomycetos	<i>Yarrowia lipolytica</i>	97%	KY110196.1	Nd	Nd
4.2.5.0.X-F	Folha	Ascomycetos	<i>Yarrowia lipolytica</i>	97%	KY110196.1	Nd	Nd
4.2.5.0.X-G	Folha	Nd	Nd	Nd	Nd	-	cocos
4.2.5.0.X-H	Folha	Nd	Nd	Nd	Nd	+	cocos
4.2.5.0.X-I	Rizoma	Nd	Nd	Nd	Nd	+	cocos
4.2.5.0.X-J	Raiz	Nd	Nd	Nd	Nd	-	cocos
4.1.5.0.X-H	Raiz	Nd	Nd	Nd	Nd	-	cocos
4.1.5.0.X-I	Rizoma	Nd	Nd	Nd	Nd	+	bacilos
4.1.5.0.X-J	Rizoma	Nd	Nd	Nd	Nd	+	bacilos

Lagoa do Açú

4.2.4.1.X-A	Folha	Proteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	96%	MF445123.1	-	bacilos
4.2.4.0.X-A	Rizoma	Proteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	97%	KR006248.1	-	bacilos
4.2.4.2.X-A	Raiz	Proteobacteria	<i>Aeromonas</i> sp.	98%	KU937368.1	-	bacilos
4.1.4.0.X-A	Folha	Proteobacteria	<i>Aeromonas veronii</i>	97%	KM277749.1	-	bacilos
4.1.4.4.X-A	Rizoma	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98%	MG214606.1	+	bacilos
4.1.4.4.X-B	Rizoma	Firmicutes	<i>Exiguobacterium indicum</i>	98%	FJ006862.1	+	bacilos
4.2.4.4.X-A	Rizoma	Proteobacteria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	AY622220.1	-	bacilos
4.1.4.2.X-A	Raiz	Proteobacteria	<i>Pseudomonas fulva</i>	97%	KC178585.1	-	bacilos
4.1.4.0.X-B	Raiz	Proteobacteria	<i>Pseudomonas monteilli</i>	98%	KR422299.1	-	bacilos
4.1.4.1.X-A	Folha	Proteobacteria	<i>Pseudomonas monteilli</i>	96%	GQ284481.1	-	bacilos
4.1.4.0.X-C	Folha	Proteobacteria	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	99%	HQ697330.1	-	bacilos
4.1.4.0.X-D	Rizoma	Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	KJ958211.1	-	bacilos
4.1.4.2.X-B	Raiz	Firmicutes	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98%	FJ357586.1	+	cocos
4.2.4.2.X-B	Raiz	Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	97%	HM137728.1	-	bacilos
4.1.4.2.X-C	Raiz	Nd	Nd	Nd	Nd	+	cocos

Não determinado (Nd), Gram positivo (+), Gram negativo (-).

Proteobactérias são Gram negativas, e a classe Gamaproteobactéria, incluindo os membros da ordem Pseudomonadales (Williams et al., 2010), é a mais representativa em estudos do ambiente aquático (Srivastava et al., 2016), o que corrobora os dados encontrados neste trabalho. Estudos realizados com *Typha angustifolia* verificaram que o filo Proteobacteria é dominante nas associações com a planta, principalmente, os subgrupos beta e gama (Li et al., 2011; Guo et al., 2015). Proteobacteria também foi o filo mais representativo em amostras de diferentes *wetlands* construídos artificialmente para o tratamento de efluentes (Long et al., 2016), incluindo aqueles que utilizam espécies de *Typha* (Zhang et al., 2015). Entretanto, representantes de Firmicutes também foram encontrados associados a *T. domingensis*. Ambos os filios, Proteobacteria e Firmicutes compreendem bactérias de interesse biotecnológico, em que várias espécies são promotoras do crescimento vegetal (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Drogue et al., 2012).

Em 2016, Shehzadi et al. (2016) obteve 41 isolados de bactérias endofíticas associados a três plantas aquáticas, sendo 24 cepas associadas a *T. domingensis*, oito associadas a *Eichhornia crassipes* e nove a *Pistiastratiotis*. As bactérias isoladas pertenciam principalmente ao gênero *Bacillus*, semelhante ao que ocorreu no presente trabalho. Todas as cepas obtidas foram testadas quanto à capacidade de degradação de efluente têxtil, em que os isolados de *Bacillus* apresentaram maior eficiência. Oito dessas cepas que se destacaram quanto à degradação de efluente, também apresentaram características de promoção do crescimento vegetal, tais como a produção de compostos indólicos e a solubilização de fosfato inorgânico, o que deve melhorar a degradação do efluente quando utilizadas nos *wetlands* em associação com as plantas aquáticas.

Assim como as bactérias, os fungos têm sido descritos em isolamentos a partir de macrófitas. You et al. (2015) mostraram a diversidade de fungos endofíticos associados a *Eleocharis kuroguwai*, *Hydrocharis dubia*, *Salvinia natans* e *Zizania latifolia*. Dos 25 gêneros identificados, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram os mais representativos. *Penicillium* também foi o gênero mais isolado a partir de *Persicaria amphibia*, *Stuckenia pectinata* e *Potamogeton pectinatus* coletadas em diferentes locais e épocas do ano (Sandberg et al., 2014). Ascomicetos endofíticos também foram encontrados em isolamentos a partir de *Eichhornia crassipes* (Almeida et al., 2015).

Todavia, este é o primeiro trabalho que isolou e identificou cepas de *Yarrowia lipolytica* associadas à macrófitas aquáticas.

3.2 Propriedades promotoras do crescimento vegetal

A interação de microrganismos e plantas ocorre ao longo de milhares de anos, selecionando as relações que favorecem microrganismos e hospedeiro. Dessa forma, bactérias e fungos associados com plantas frequentemente promovem o crescimento vegetal e essas características também foram avaliadas nos microrganismos isolados de *T. domingensis*. Como apresentado na Tabela 3, das 40 cepas, 19 produziram compostos indólicos. O gênero mais representativo dessa característica foi *Pseudomonas*. Estudos relatam que as auxinas produzidas por bactérias e fungos têm a capacidade de melhorar e promover o crescimento vegetal (Chaiarn & Lumyong, 2011; Chutima & Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014).

Ao avaliar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), foi possível verificar que 60% das cepas isoladas, ou seja, 24 bactérias foram capazes de captar N₂ atmosférico em pelo menos uma das condições testadas. Saha e colaboradores (2016) isolaram e caracterizaram 10 bactérias de *T. angustifolia*. A produção de auxinas e de sideróforos e a presença do gene *nifH* foram avaliadas, apresentando resultado positivo. O consórcio das bactérias foi inoculado e promoveu o crescimento de arroz, com aumento significativo no comprimento da raiz, na biomassa seca e no teor de clorofila, mostrando que as propriedades promotoras do crescimento vegetal são vantajosas ao hospedeiro.

Juntamente com a produção de AIA e FBN, a habilidade de solubilizar fosfato foi medida nas cepas isoladas de *T. domingensis*. Através da presença do índice de solubilização, foi verificado que 80% dos isolados, 31 cepas, detém essa característica. Ambas as cepas da levedura *Y. lipolytica* apresentaram os maiores IS.

Tabela 3: Caracterização dos microrganismos isolados de *T. domingensis* quanto a propriedades promotoras do crescimento vegetal.

Cepa	Espécie isolada	Indóis ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	FBN ^c			IS (cm) ^b
			JMV	NFb	JNFb	
4.1.5.0.X-A	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	+	0,33
4.1.5.0.X-B	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	+	-
4.1.5.0.X-C	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	-	-
4.1.5.0.X-D	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	-	-
4.1.5.1.X-A	<i>Bacillus subtilis</i>	10,12	+	-	+	-
4.2.5.0.X-A	<i>Enterobacter asburiae</i>	11,95	-	-	+	1,17
4.2.5.0.X-B	<i>Enterobacter asburiae</i>	9,94	+	+	+	1,93
4.2.5.0.X-C	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+	-	-
4.2.5.2.X-A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16,32	+	+	+	0,70
4.2.5.4.X-A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38,26	-	+	+	1,29
4.1.5.0.X-E	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	Nd	-	-	-	1,46
4.1.5.0.X-F	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	-	-	-	-	0,67
4.2.5.2.X-B	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	38,92	+	+	+	1,27
4.2.5.0.X-D	<i>Serratia marcescens</i>	8,86	+	-	+	1,43
4.2.5.2.X-C	<i>Serratia marcescens</i>	31,28	+	+	+	1,07
4.1.5.0.X-G	<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	+	1,43
4.2.5.0.X-E	<i>Yarrowia lipolytica</i>	20,63	-	-	-	1,98
4.2.5.0.X-F	<i>Yarrowia lipolytica</i>	13,79	-	-	-	2,15
4.2.5.0.X-G	Nd	-	+	+	+	0,93
4.2.5.0.X-H	Nd	-	-	-	-	1,33
4.2.5.0.X-I	Nd	10,24	+	+	+	1,87
4.2.5.0.X-J	Nd	26,53	-	+	+	1,17
4.1.5.0.X-H	Nd	-	+	-	+	1,33
4.1.5.0.X-I	Nd	-	-	-	-	-
4.1.5.0.X-J	Nd	-	-	-	-	0,93
4.2.4.1.X-A	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	+	+	0,40
4.2.4.0.X-A	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	-	+	0,60
4.2.4.2.X-A	<i>Aeromonas</i> sp.	Nd	-	-	-	0,33
4.1.4.0.X-A	<i>Aeromonas veronii</i>	-	-	-	-	0,20
4.1.4.4.X-A	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	+	+	-	-
4.1.4.4.X-B	<i>Exiguobacterium indicum</i>	3,19	+	+	-	-
4.2.4.4.X-A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	0,67
4.1.4.2.X-A	<i>Pseudomonas fulva</i>	9,87	-	-	-	1,40
4.1.4.0.X-B	<i>Pseudomonas monteilli</i>	6,50	+	-	-	1,43
4.1.4.1.X-A	<i>Pseudomonas monteilli</i>	9,96	-	+	-	1,47
4.1.4.0.X-C	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	13,45	-	-	-	1,07
4.1.4.0.X-D	<i>Pseudomonas putida</i>	15,87	-	-	-	1,50
4.1.4.2.X-B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Nd	-	-	-	-
4.2.4.2.X-B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	0,67
4.1.4.2.X-C	Nd	12,23	-	-	-	1,53

^aProdução de compostos indólicos, incluindo auxina.

^bSolubilização de fosfato calculado através do índice de solubilização (IS).

^cCapacidade de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Não determinado (Nd), positivo (+) e negativo (-).

Ghosh et al. (2014) estudaram bactérias oxidantes de ferro isoladas de *T. angustifolia* descritas como solubilizadoras de fosfato e produtoras de AIA e sideróforos. A inoculação dessas cepas na macrófita aumentou a absorção de ferro e propiciou aumento da biomassa vegetal. O fósforo (P) é segundo mineral mais importante para nutrição vegetal, depois do N. Entretanto, a maior parte desse elemento encontra-se insolúvel no solo. Bactérias e fungos têm a capacidade de liberar fosfato orgânico ou solubilizar formas insolúveis de fosfato inorgânico, viabilizando o crescimento da planta (Oteino et al., 2015). Em nosso estudo, todas as cepas de *Pseudomonas* solubilizaram fosfato de cálcio terciário, assim como descrito por Oteino et al. (2015) e Hussain et al. (2013).

A partir dos testes realizados, foi possível identificar que 27,5% dos isolados de *T. domingensis*, 11 cepas, apresentaram todas as características de promoção do crescimento vegetal avaliadas. Foram eles: 4.2.5.0.X.I, 4.2.5.0.X.J, *Enterobacter asburiae* (4.2.5.0.X.A e 4.2.5.0.X.B), *Klebsiella pneumoniae* (4.2.5.2.X.A e 4.2.5.4.X.A), *Raoultella ornithinolytica* (4.2.5.2.X.B), *Serratia marcescens* (4.2.5.0.X.D e 4.2.5.2.X.C), *Pseudomonas monteilii* (4.1.4.0.X.B e 4.1.4.1.X.A).

Diversas espécies do gênero *Pseudomonas* e *Enterobacter* apresentam características de promoção do crescimento vegetal (Ahemad & Kibret, 2014). Deepa et al. (2010) verificaram que a inoculação de *E. asburiae* em feijão-caupi, aumenta o comprimento da raiz e da parte aérea, a biomassa, o número de raízes e o diâmetro do caule das mudas (Deepa et al., 2010). *P. monteilii* isolada de trigo solubiliza fósforo, potássio e zinco, produz AIA, giberelinas e sideróforos, e fixa nitrogênio (Pandya et al., 2014; Verma et al., 2014). Plantas de milho inoculadas com espécies de *Pseudomonas* apresentaram níveis mais altos de prolina, açúcares e aminoácidos livres, e níveis baixos de enzimas antioxidantes. Assim, estes microrganismos protegem a planta do estresse hídrico e aumentam a biomassa vegetal (Sandhya et al., 2010).

Ji et al. (2014) descreveram quatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de arroz, produtoras de AIA e sideróforos, solubilizadoras de fosfato e que possuem atividade antifúngica. Sua inoculação na planta aumentou o peso fresco e seco da parte aérea e da raiz (Ji et al., 2014). Esta espécie destaca-se ainda pela produção de auxina e fixação biológica de nitrogênio (Govindarajan et al., 2007; Sachdev et al., 2009; Chaiharn et al., 2011).

O sequenciamento do genoma de *Serratia marcescens* permitiu encontrar genes com funções para biossíntese de auxina e solubilização de fosfato (Khan et al., 2017). Cepas isoladas de coqueiro e abóbora fixam nitrogênio e produzem sideróforos. Sua inoculação aumenta a biomassa vegetal, produzindo mudas mais saudáveis (Selvakumar et al., 2007; George et al., 2013). Genes de promoção do crescimento também já foram identificados em *R. ornithinolytica* (Thijs et al., 2014).

O uso da interação plantas e microrganismos apresenta vantagens econômicas, sendo explorado na agricultura para incrementar a produtividade e reduzir os custos com fertilizantes e pesticidas (Bastam et al., 2014). Por isso, a maior parte dos estudos se concentra no potencial biotecnológico da associação entre plantas terrestres de interesse agrônômico com microrganismos benéficos (Li & Ramakrishna, 2011; Naddem et al., 2014; Xun et al., 2015; Kong & Glick, 2017). Bioinoculantes estão disponíveis no mercado para produção de alimentos. No entanto, os estudos são escassos no ambiente aquático (Fidalgo et al., 2016; Szymanska et al., 2016), não havendo bioinoculantes para plantas usadas no tratamento de efluentes. Mas já foi observado, por exemplo, que a bioaugmentação de *Bacillus endophyticus*, *Paenobacillus macerans* e *Bacillus pumilus* em *Typha latifolia* promove o crescimento da planta e favorece a fitorremediação de Fe, Ni, Zn, Cu, Cr, Pb e Cd (Tiwari et al., 2013). Plantas mais saudáveis, em maior quantidade, captam mais substâncias do ambiente, inclusive os contaminantes metálicos (Vacheron et al., 2013). Logo, estudar a microbiota das plantas aquáticas usadas no sistema de *wetlands* quanto à resistência a contaminantes deve aumentar a compreensão dos mecanismos de interação, contribuindo para geração de novos produtos e processos biotecnológicos para a indústria.

3.3 Resistência a cobre nos microrganismos associados a *T. domingensis*

Todos os microrganismos isolados foram avaliados quanto ao perfil de resistência a Cu em meio sólido. Apenas três isolados apresentaram CIM de 1 mmol L⁻¹, a concentração mais baixa utilizada. Dezesete isolados apresentaram CIM de 3 mmol L⁻¹, outros seis de 5 mmol L⁻¹ e sete isolados de 7 mmol L⁻¹. As bactérias mais resistentes pertencem ao gênero *Serratia*, com CIM de 9 e 11 mmol L⁻¹. As cepas de *Y. lipolytica* destacaram-se, apresentando a CIM mais elevada, de 23 mmol L⁻¹, muito superior as bactérias estudadas (Tabela 4).

Para crescer em elevadas concentrações de metal, os microrganismos precisam dispor de mecanismos de resistência. Bactérias possuem genes especializados na detoxificação intracelular de Cu. Os mais estudados são *cue* e *cus*, envolvidos na detoxificação de Cu no periplasma; e *cop*, que atua no efluxo de Cu do citoplasma (Solioz et al., 2010; Bondarczuk & Piotrowska, 2013). Espécies de *Serratia*, *Enterobater* e *Klebsiella* isoladas do mar apresentaram perfil de resistência entre 1 a 15 mmol L⁻¹ (Çardak & Altug, 2014), semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho. Bactérias dessa família *Enterobacteriaceae* possuem também o gene *pco*, transmitido por plasmídeo, que pode aumentar três vezes a resistência a Cu sobre os mecanismos endógenos (Stahlin et al., 2016). Isso justifica que as cepas de bactérias isoladas de *T. domingensis* mais resistentes a Cu pertençam a esse grupo.

Diferentes cepas de *Enterobacter* sp. isoladas de sorgo, com característica de promoção do crescimento vegetal, apresentaram CIM entre 1 e 3,3 mmol L⁻¹ de Cu (Li et al., 2016; Sharaff et al., 2017). Estas concentrações são pelo menos 50% menor se comparado ao CIM obtida para as cepas do mesmo gênero isoladas no presente trabalho. Ainda assim, essas bactérias foram utilizadas em ensaios de biorremediação de cobre com efeitos promissores no aumento de biomassa vegetal e na remoção desse metal (Li et al., 2016; Sharaff et al., 2017).

Tabela 4: Concentração inibitória mínima de CuSO₄ dos microrganismos isolados de *T. domingensis*

Cepa	Espécie	CIM^a
4.1.4.4.X-B	<i>Exiguobacterium indicum</i>	1
4.1.4.2.X-B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
4.1.4.2.X-C	Nd	1
4.1.5.0.X-D	<i>Bacillus cereus</i>	3
4.2.5.0.X-C	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
4.1.5.0.X-E	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	3
4.1.5.0.X-F	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	3
4.1.5.0.X-I	Nd	3
4.1.5.0.X-J	Nd	3
4.2.4.1.X-A	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3
4.2.4.0.X-A	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3
4.2.4.2.X-A	<i>Aeromonas</i> sp.	3
4.1.4.0.X-A	<i>Aeromonas veronii</i>	3
4.2.4.4.X-A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3
4.1.4.2.X-A	<i>Pseudomonas fulva</i>	3
4.1.4.0.X-B	<i>Pseudomonas monteilli</i>	3
4.1.4.1.X-A	<i>Pseudomonas monteilli</i>	3
4.1.4.0.X-C	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	3
4.1.4.0.X-D	<i>Pseudomonas putida</i>	3
4.2.4.2.X-B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
4.1.5.0.X-A	<i>Bacillus</i> sp.	5
4.1.5.0.X-B	<i>Bacillus cereus</i>	5
4.1.5.0.X-C	<i>Bacillus cereus</i>	5
4.1.5.1.X-A	<i>Bacillus subtilis</i>	5
4.2.5.2.X-A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
4.1.4.4.X-A	<i>Bacillus thuringiensis</i>	5
4.2.5.0.X-A	<i>Enterobacter asburiae</i>	7
4.2.5.0.X-B	<i>Enterobacter asburiae</i>	7
4.2.5.4.X-A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
4.2.5.2.X-B	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	7
4.2.5.0.X-G	Nd	7
4.2.5.0.X-I	Nd	7
4.2.5.0.X-J	Nd	7
4.2.5.0.X-D	<i>Serratia marcescens</i>	9
4.2.5.2.X-C	<i>Serratia marcescens</i>	9
4.2.5.0.X-H	Nd	9
4.1.5.0.X-G	<i>Serratia</i> sp.	11
4.1.5.0.X-H	Nd	11
4.2.5.0.X-E	<i>Yarrowia lipolytica</i>	23
4.2.5.0.X-F	<i>Yarrowia lipolytica</i>	23

^aCIM: Concentração Inibitória Mínima.^bBactéria utilizada como controle negativo.
Não determinado (Nd).

3.4 CIM de cobre para *Yarrowia lipolytica*

Como a levedura *Y. lipolytica* apresentou a CIM de Cu mais elevada, a cepa foi selecionada para maiores investigações. Inicialmente, foram registradas mudanças na colônia na presença de Cu, bem como nas células, quando visualizadas ao microscópio. Na Figura 1A, pode-se observar que na menor concentração de Cu utilizada, 1 mmol L⁻¹, não houve diferença no tamanho da colônia comparada ao controle. A partir de 5 mmol L⁻¹ houve redução no tamanho e também foi verificada a produção de pigmento de cor marrom claro, semelhante à melanina, que deixou a colônia mais escura quando comparada ao controle. A partir de 20 mmol L⁻¹ foram registradas apenas algumas pequenas colônias individuais, que desaparecem em 23 mmol L⁻¹ de CuSO₄ (Figura 1B).

Na microscopia ótica, foi possível observar que o Cu provocou alterações na forma das células (Figura 1). Na ausência de metal não foi observada diferença entre as células do centro e da borda da colônia, que apresentaram o mesmo aspecto leveduriforme. Em 1 mmol L⁻¹, já foram encontradas células aberrantes tanto no centro como na borda das colônias. Na concentração de 5 mmol L⁻¹, as células do centro permanecem redondas, mas as da borda apresentaram aspecto alongado. Em 10 mmol L⁻¹, foram observadas pseudo-hifas na borda da colônia, que não foram encontradas no centro e podem representar uma resposta de resistência da levedura. A partir de 15 mmol L⁻¹, o estresse causado pelo metal aumentou o tamanho das células, que passaram a ter um formato redondo tanto no centro quanto na borda da colônia e as células da borda começam a ter aspecto escuro e granuloso (Figura 1A). Esse aspecto se mantém a partir de 20 mmol L⁻¹, não sendo mais possível diferenciar células do centro e borda devido ao tamanho reduzido das colônias (Figura 1B).

Aparentemente, as células da borda da colônia sofrem mais do que as do centro, como observado nas concentrações de 5, 10 e 15 mmol L⁻¹ de Cu (Figura 1A). A partir de 20 mmol L⁻¹ as células já estão bastante prejudicadas, em que não se observa esse comportamento. Isto pode ocorrer porque as células do centro são protegidas pelas células da borda, por algum mecanismo de *quorum sensing*, de modo que o dano mais severo inicie na borda da colônia (Palkova & Váchová, 2016). Outro aspecto relevante, é que a borda da colônia deve ser o ponto onde há mais metal disponível para a levedura, o que também justifica os resultados encontrados.

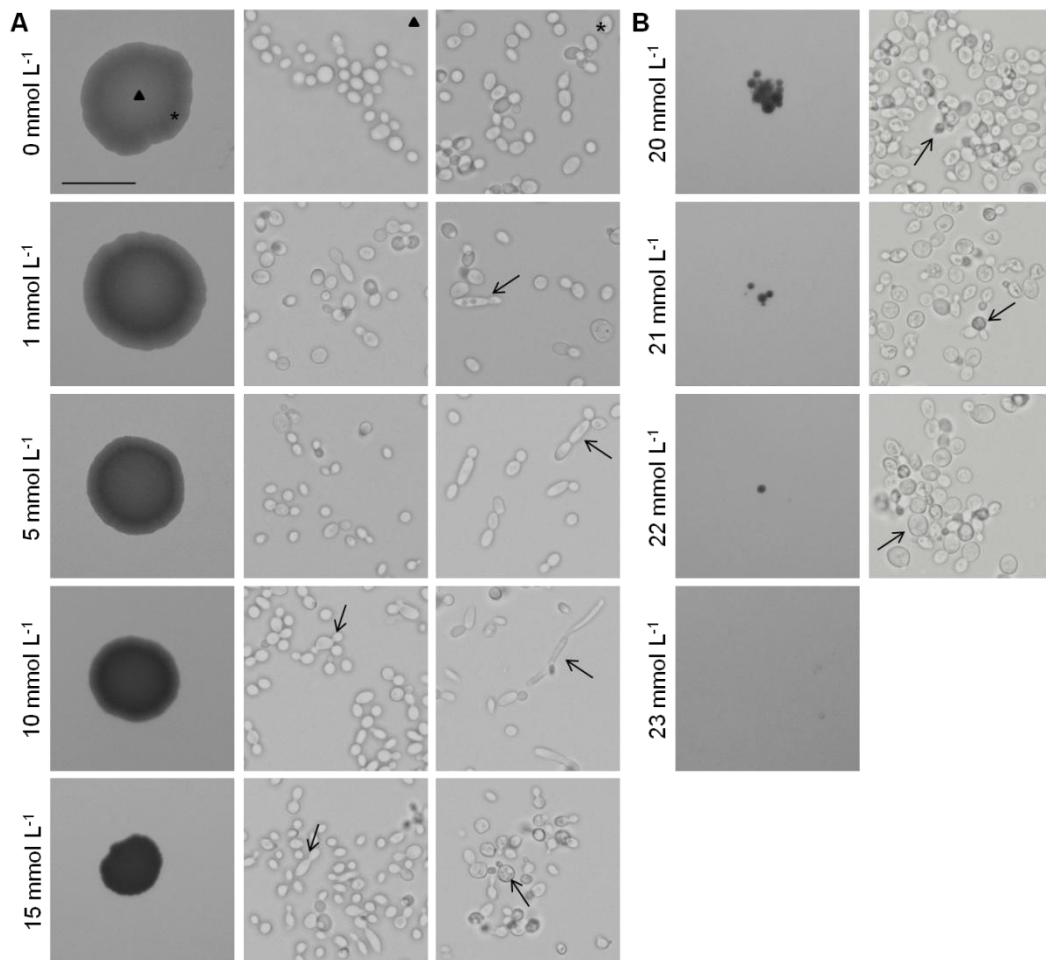


Figura 1: Caracterização morfológica das colônias e das células de *Y. lipolytica* em concentrações crescentes de CuSO_4 , em meio sólido. A) \blacktriangle representa as células retiradas do centro da colônia e o * representa as células retiradas da borda da colônia. B) Sem distinção entre as células do centro e da borda da colônia. Microscópio com aumento de 400X. As setas indicam alterações causadas pelo Cu nas células. A barra de escala representa 1 cm.

As leveduras são consideradas organismos celulares únicos, entretanto, são capazes de se diferenciar em tipos celulares específicos, adaptando sua forma e fisiologia, comunicando-se através de *quorum sensing* no biofilme. A distribuição espacial das células na colônia permite a formação de gradientes de nutrientes, metabólitos e moléculas de sinalização, que podem participar da especialização celular. As análises da arquitetura interna e a diferenciação celular levaram à identificação de características que indicam a existência de diferentes estádios de desenvolvimento em leveduras (Palkova & Váchová, 2016). Colônias estruturadas de biofilme de *Candida* e *Cryptococcus* spp. formam colunas compostas por células ovais na parte superior e células filamentosas, incluindo pseudo-hifas e hifas, na parte aderida. As células mais resistentes são formadas no início do desenvolvimento de colônias em camadas superficiais, enquanto as células dentro

da colônia estão incorporadas em uma abundante matriz extracelular que bloqueia a penetração de diferentes espécies químicas (Palkova & Váchová, 2016). Essas adaptações estão diretamente associadas às condições ambientais, especialmente quando expostas a situações de estresse como ocorrido no presente trabalho.

Os fungos apresentam mecanismos diversos de adaptação a íons metálicos. A mudança de morfologia é um importante indicador de resposta ao estresse no metabolismo (Morano et al., 2012). *Y. lipolytica* tende a sofrer transição dimórfica sob estresses ambientais. Seu aspecto morfológico é de células ovais, entretanto, células redondas tem maior superfície de contato para absorver nutrientes e, conseqüentemente, íons metálicos que possam estar presentes no meio. Isso ocorre porque o aumento do tamanho da sua superfície está associado com o aumento da capacidade de bioabsorção, por aumentar a área de contato da célula com o meio (Xu et al., 2017), o que pode justificar a mudança de células ovais para pseu-hifas observadas no ensaio de CIM, quando a levedura foi exposta a Cu.

Além das alterações estruturais, foram observadas diferenças na pigmentação das colônias expostas a concentrações crescentes desse elemento. Ito et al. (2007a) observaram a produção de melanina como mecanismo constitutivo das células de *Y. lipolytica* atuante na detoxificação de Cu a partir de 6 mmol L⁻¹, favorecendo sua deposição na parede celular. A melanina é um composto fenólico que possui vários sítios de ligações com metais e por isso apresenta propriedades antioxidantes. Este composto atua trocando elétrons, oxidando ou reduzindo metais, o que minimiza os efeitos tóxicos desses contaminantes em *Y. lipolytica* (Até et al., 2013) e pode ser o pigmento encontrado em nosso estudo.

Para avaliar melhor a resposta da cepa *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F ao Cu, foram avaliados os efeitos do metal nas células em suspensão. Como observado na Figura 2A, da mesma forma que na condição de placa de Petri, o estresse causado pelo metal provocou alterações na morfologia celular em 5,0 e 7,5 mmol L⁻¹. Foram observadas mais células em fase de divisão celular, com a presença de brotos ligados a célula mãe. Além disso, o tamanho das células não foi homogêneo na cultura, apresentando brotos com aspecto muito reduzido, após 24 h de incubação (Figura 2A). O aspecto morfológico das células em 48 e 72 h deverá ser avaliado, para buscar mais modificações em resposta ao estresse.

No âmbito do crescimento, com 24 h de cultivo houve redução no número de células em todas as concentrações testadas quando comparado ao controle até atingir a CIM em 10 mmol L^{-1} (Figura 2B). Com 48 e 72 h de crescimento, o resultado foi diferente. O Cu na concentração de 1 mmol L^{-1} foi utilizado como micronutriente, estimulando o crescimento celular. Já em 5 mmol L^{-1} , o número de células diminuiu, o que não aconteceu em 48 h na concentração de $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Apesar de a concentração ser a mesma, o maior tempo de exposição deve ter aumentado os danos celulares, diminuindo o número de células após 72 h.

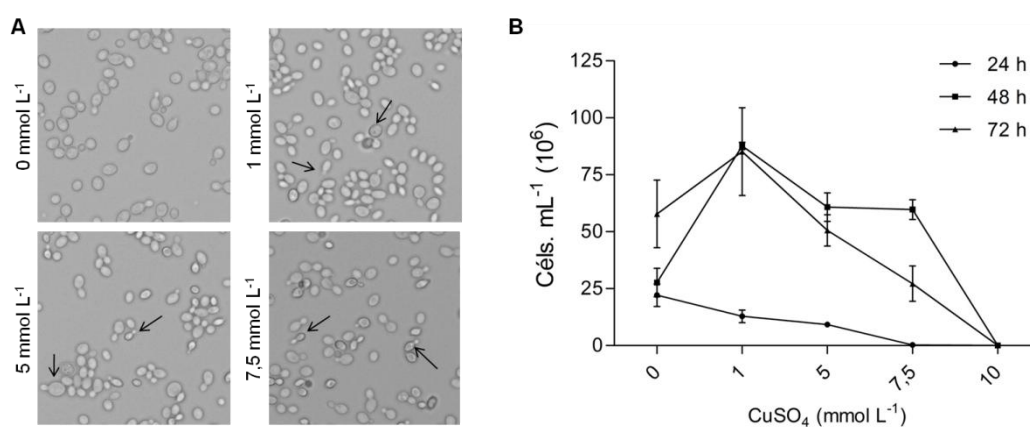


Figura 2: Efeito das concentrações crescentes de CuSO_4 sobre o crescimento de *Y. lipolytica*. A) Microscopia óptica das células de levedura após 24 h inoculadas na presença e ausência de cobre (aumento de 400x) e B) o efeito da inibição do cobre no crescimento da cultura, segundo Two-way ANOVA ($p \leq 0,01$).

Outros mecanismos moleculares têm sido descritos para a resistência ao Cu em leveduras, mas poucos trabalhos são relatados com *Y. lipolytica*. García et al. (2002) descreveu cepas de *Y. lipolytica* resistentes a CuSO_4 com CIM de 4 mmol L^{-1} , após 4 dias de incubação. Esta concentração é mais de cinco vezes menor do que a CIM obtida para a cepa *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F neste trabalho. O fator de transcrição responsivo ao Cu, *YICRF1*, foi relacionado a característica de resistência da levedura, e sua deleção resulta em sensibilidade a esse metal (García et al., 2002). Metalotioneínas também foram identificadas nessas leveduras, atuando na detoxificação de Cu. Cepas mutantes para o fator *YICRF1* aumentam a expressão dessas proteínas em resposta a presença do metal (García et al., 2002). Strouh al et al. (2003) mostraram que a produção de metalotioneínas também foi induzida em *Y. lipolytica* pelo aumento da concentração intracelular de Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} .

Entretanto estes mecanismos ainda não foram determinados na cepa isolada no presente trabalho.

O cobre também reduziu o crescimento de *Y. lipolytica mhy 1-1* a partir de 2 mmol L⁻¹ e inibido em 8 mmol L⁻¹. Somado a isso, foi verificado que na concentração de 2 mmol L⁻¹ houve aumento da atividade de fosfatase ácida nas culturas da levedura. Essa enzima é responsável pela liberação de fosfato inorgânico e participa do efluxo intracelular de Cu ao mediar à formação de complexos de cobre-fosfato (Ito et al., 2007b). Dessa forma, foi visto que *Y. lipolytica mhy 1-1* acumula o excesso de Cu na parede celular até a fase estacionária, quando ocorre a extrusão do metal através dos complexos de cobre-fosfato (Ito et al., 2007c). Recentemente, Dil et al.(2017) mostraram que o principal mecanismo utilizado por *Y. lipolytica* para captar não apenas Cu, mas também Hg e Pb é a biossorção. Neste processo, os poluentes são absorvidos e acumulados pelos microrganismos (Mani & Kumar, 2014).

A resposta dessa levedura já vem sendo estudada para outros metais, incluindo ainda Zn, Ni, Co, Cr e Cd (Strouhal et al., 2003; Bankar et al., 2009; Asfaram et al., 2016). Com isso, destaca-se que, *Y. lipoytica* UENF-4.2.5.0.X.F isolada de *T. domingensis* tem elevada resistência a Cu, mas também deve ser testada para outros contaminantes, apresentando potencial para ser utilizada como bioinoculante em estações de tratamento de efluentes industriais do tipo *wetlands*, pois além de resistir ao estresse por metal, possui propriedades promotoras do crescimento de planta.

4 Conclusão

O isolamento e a identificação de 40 microrganismos com características para promover o crescimento vegetal permitiu a obtenção de espécies cultiváveis que podem gerar inúmeras aplicações biotecnológicas. O ensaio de CIM para Cu permitiu identificar cepas resistentes a este metal, com destaque para *Yarrowia lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F. Este é um organismo candidato a ensaios de interação com plantas aquáticas, visando ganho de biomassa e remoção dos metais de corpos hídricos.

Referências

ADAMS, A.A. et al. Accumulation of heavy metals by naturally colonising *Typha domingensis* (Poales: Typhaceae) in waste-rock dump leachate storage ponds in a gold–copper mine in the central table lands of New South Wales, Australia. *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*, v. 27, n. 4, p. 294-307, 2013.

ADEDIRAN, G.A. et al. Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 490-499, 2015.

ALMEIDA, T.T. et al. 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*, v. 14, n. 2, p. 4920-4931, 2015.

APTE, M. et al. 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures. *Journal of nanobiotechnology*, v. 11, n. 1, p. 2, 2013.

ASFARAM, A.; GHAEDI, M.; GHEZELBASH, G.R. Biosorption of Zn 2+, Ni 2+ and Co 2+ from water samples onto *Yarrowia lipolytica* ISF7 using a response surface methodology, and analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *RSC Advances*, v. 6, n. 28, p. 23599-23610, 2016.

BALDANI, J.I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.

BANKAR, A.V.; KUMAR, A.R.; ZINJARDE, S.S. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170, n. 1, p. 487-494, 2009.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BIELMYER-FRASER, G.K. et al. Assessment of metal contamination in the biota of four rivers experiencing varying degrees of human impact. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 189, n. 1, p. 23, 2017.

BONDARCZUK, K.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology*, v. 29, n. 6, p. 397-405, 2013.

ÇARDAK, M.; ALTUG, G. Species distribution and heavy metal resistance of *Enterobacteriaceae* members isolated from Istanbul Strait. *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 23, p. 2620-2626, 2014.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 173-181, 2011.

CHUTIMA, R.; LUMYONG, S. Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. *Symbiosis*, v. 56, n. 1, p. 35-44, 2012.

DA CONCEIÇÃO GOMES, M.A.; SUZUKI, M.S. Aspectos ambientais e históricos da Lagoa do Campeço. *Perspectivas OnLine 2007-2011*, v. 2, n. 7, 2014.

DEEPA, C.K.; DASTAGER, S.G.; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on

cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 7, p. 1233-1240, 2010.

DEY, P. et al. Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. *Journal of Hazardous Materials*, v. 318, p. 679-685, 2016.

DIL, E.A. et al. Highly efficient simultaneous biosorption of Hg²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ by Live yeast *Yarrowia lipolytica* 70562 following response surface methodology optimization: Kinetic and isotherm study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 48, p. 162-172, 2017.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E), 1999.

DROGUE, B. et al. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?. *Research in Microbiology*, v. 163, n. 8, p. 500-510, 2012.

ESTEVEES, F.A. Fundamentos da Limnologia. Rio de Janeiro: Ed. Interciência/FINEP, 602p, 1998.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. Enzyme activities in vineyard soils long-term treated with copper-based fungicides. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 12, p. 2119-2127, 2010.

FIDALGO, C. et al. Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal (loid) contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 10, p. 10200-10214, 2016.

FOTI, M. et al. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 7, p. 2093-2100, 2007.

GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 609-643, 2010.

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, v. 189, n. 1-2, p. 147-163, 2003.

GALPERIN, M.Y. Genome diversity of spore-forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*, v. 1, n. 2, p. TBS-0015-2012, 2013.

GARCÍA, S. et al. A copper-responsive transcription factor, CRF1, mediates copper and cadmium resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 40, p. 37359-37368, 2002.

GEORGE, P. et al. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 1, p. 109-117, 2013.

GHOSH, U.D. et al. Root associated iron oxidizing bacteria increase phosphate nutrition and influence root to shoot partitioning of iron in tolerant plant *Typha angustifolia*. *Plant and Soil*, v. 381, n. 1-2, p. 279-295, 2014.

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.W.; WEON, H.Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 7, p. 997-1006, 2007.

GUO, Y.; GONG, H.; GUO, X. Rhizosphere bacterial community of *Typha angustifolia* L. and water quality in a river wetland supplied with reclaimed water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 6, p. 2883-2893, 2015.

HADAD, H.R.; MAINE, M.A.; BONETTO, C.A. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*, v. 63, n. 10, p. 1744-1753, 2006.

HARGUINTEGUY, C. A. et al. The macrophytes *Potamogeton pusillus* L. and *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. as potential bioindicators of a river contaminated by heavy metals. *Microchemical Journal*, v. 124, p. 228-234, 2016.

HUSSAIN, M.I. et al. Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil Environmental*, v. 32, n. 1, p. 71-78, 2013.

IJAZ, A. et al. Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant and Soil*, v. 405, n. 1-2, p. 179-195, 2016.

ITO, H. et al. Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. *Biometals*, v. 20, n. 5, p. 773-780, 2007.

ITO, H. et al. Copper extrusion after accumulation during growth of copper-tolerant yeast *Yarrowia lipolytica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 62, n. 1-2, p. 77-82, 2007.

ITO, H. et al. Effect of copper on acid phosphatase activity in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 62, n. 1-2, p. 70-76, 2007.

JUNK, W.J. et al. Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 24, n. 1, p. 5-22, 2014.

KHAN, A.R. et al. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PloS One*, v. 12, n. 2, p. e0171534, 2017.

KONG, Z.; GLICK, B.R. The role of bacteria in phytoremediation. *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, v. 5, p. 12, 2017.

KUMAR, U. Agricultural products and by-products as a low cost adsorbent for heavy metal removal from water and wastewater: A review. *Scientific Research and Essays*, v. 1, n. 2, p. 033-037, 2006.

KUMLA, J. et al. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 707-720, 2014.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 5, p. 1216-1223, 1997.

LI, K.; RAMAKRISHNA, W. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*, v. 189, n. 1-2, p. 531-539, 2011.

LI, Y. et al. Increased growth and root Cu accumulation of *Sorghum sudanense* by endophytic enterobacter sp. K3-2: implications for *Sorghum sudanense* biomass production and phytostabilization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 124, p. 163-168, 2016.

LI, Y.H. et al. Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China). *Research in Microbiology*, v. 162, n. 2, p. 124-131, 2011.

LOMINCHAR, M.A.; SIERRA, M.J.; MILLÁN, R. Accumulation of mercury in *Typha domingensis* under field conditions. *Chemosphere*, v. 119, p. 994-999, 2015.

LONG, Yan et al. Influences of plant type on bacterial and archaeal communities in constructed wetland treating polluted river water. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 19, p. 19570-19579, 2016.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 541-556, 2009.

MA, Y. et al. Halophiles 2010: life in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 21, p. 6971-6981, 2010.

MACKIE, K.A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of copper in vineyards—a mini review. *Environmental Pollution*, v. 167, p. 16-26, 2012.

MANI, D.; KUMAR, C. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 11, n. 3, p. 843-872, 2014.

MIAO, S.L.; SKLAR, F.H. Biomass and nutrient allocation of sawgrass and cattail along a nutrient gradient in the Florida Everglades. *Wetlands Ecology and Management*, v. 5, n. 4, p. 245-264, 1997.

MORANO, K.A.; GRANT, C.M.; MOYE-ROWLEY, W.S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v. 190, n. 4, p. 1157-1195, 2012.

MUFARREGE, M.M. et al. Adaptability of *Typha domingensis* to high pH and salinity. *Ecotoxicology*, v. 20, n. 2, p. 457-465, 2011.

MUFARREGE, M.M. et al. The ability of *Typha domingensis* to accumulate and tolerate high concentrations of Cr, Ni, and Zn. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 1, p. 286-292, 2015.

NADEEM, S.M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 2, p. 429-448, 2014.

OTIENO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 745, 2015.

PALKOVA, Z.; VÁCHOVÁ, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. In: *Seminars in Cell & Developmental biology*. Academic Press, 2016. p. 110-119.

PANDYA, N.D.; DESAI, P.V. Screening and characterization of GA3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. *Int International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 3, p. 110-115, 2014.

PANG, S. et al. Characterization of bacterial community in biofilm and sediments of wetlands dominated by aquatic macrophytes. *Ecological Engineering*, v. 97, p. 242-250, 2016.

PELCZAR Jr, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R.; *Microbiology: concepts and applications*. McGrawHill; 1993; 75-76 pp.

PUSEY, Paul L.; WILSON, Charles L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. U.S. Patent n. 4,764,371, 16 ago. 1988.

RAJKUMAR, M. et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 6, p. 1562-1574, 2012.

RUTTKAY-NEDECKY, B. et al. The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 3, p. 6044-6066, 2013.

RYCEWICZ-BORECKI, M.; MCLEAN, J.E.; DUPONT, R. Ryan. Bioaccumulation of copper, lead, and zinc in six macrophyte species grown in simulated stormwater bioretention systems. *Journal of Environmental Management*, v. 166, p. 267-275, 2016.

SACHDEV, D.P. et al. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. Indian Journal of Experimental Biology, 2009.

SAHA, C. et al. A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. Plant Biology, v. 18, n. 6, p. 938-946, 2016.

SANDBERG, D.C.; BATTISTA, L.J.; ARNOLD, A.E. Fungal endophytes of aquatic macrophytes: diverse host-generalists characterized by tissue preferences and geographic structure. Microbial Ecology, v. 67, n. 4, p. 735-747, 2014.

SANDHYA, V.S.K.Z. et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. Plant Growth Regulation, v. 62, n. 1, p. 21-30, 2010.

SANTOS, K.P.; OLIVEIRA, V.P.S.; FREITAS, L.N.; BATISTA, S.L.G.; MENEZES, G.G. Determinação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos da Lagoa do Açú, RJ. Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, v. 9, p. 7-16, 2015.

SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiological Research, v. 183, p. 92-99, 2016.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. Plant and Soil, v. 172, n. 2, p. 261-269, 1995.

SELVAKUMAR, G. et al. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). Letters in Applied Microbiology, v. 46, n. 2, p. 171-175, 2008.

SESSITSCH, A. et al. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry, v. 60, p. 182-194, 2013.

SHARAFF, M.; KAMAT, S.; ARCHANA, G. Analysis of copper tolerant rhizobacteria from the industrial belt of Gujarat, western India for plant growth promotion in metal polluted agriculture soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 138, p. 113-121, 2017.

SHEHZADI, M. et al. Ecology of bacterial endophytes associated with wetland plants growing in textile effluent for pollutant-degradation and plant growth-promotion potentials. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, v. 150, n. 6, p. 1261-1270, 2016.

SHEHZADI, M. et al. Enhanced degradation of textile effluent in constructed wetland system using *Typha domingensis* and textile effluent-degrading endophytic bacteria. Water Research, v. 58, p. 152-159, 2014.

SOLIOZ, M. et al. Response of Gram-positive bacteria to copper stress. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 15, n. 1, p. 3, 2010.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

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

STAEHLIN, B.M. et al. Evolution of a heavy metal homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in enterobacteria. Genome Biology and Evolution, v. 8, n. 3, p. 811-826, 2016.

STOUT, L.; NÜSSLEIN, K. Biotechnological potential of aquatic plant–microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 339-345, 2010.

STROUHAL, M. et al. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry*, v. 60, n. 1-2, p. 29-36, 2003.

STRUNGARU, S.A. et al. Influence of urban activity in modifying water parameters, concentration and uptake of heavy metals in *Typha latifolia* L. into a river that crosses an industrial city. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 13, n. 1, p. 5, 2015.

SZYMANSKA, S. et al. Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L.–community structure and metabolic potential. *Microbiological Research*, v. 192, p. 37-51, 2016.

THIJS, S. et al. Draft genome sequence of *Raoultella ornithinolytica* TNT, a trinitrotoluene-denitrating and plant growth-promoting strain isolated from explosive-contaminated soil. *Genome Announcements*, v. 2, n. 3, p. e00491-14, 2014.

THOMPSON, J.D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TIWARI, S.; SINGH, S.N.; GARG, S.K. Induced phytoremediation of metals from fly ash mediated by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Environmental Biology*, v. 34, n. 4, p. 717, 2013.

USEPA (2014) Protection of Environment, Appendix A to 40 CFR, Part 423 - 126 Priority Pollutants. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>

VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 356, 2013.

VERMA, P. et al. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, v. 3, n. 5, p. 432-447, 2014.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

WEISBURG, W.G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, v. 3, n. 2, p. 163, 2008.

WILLIAMS, K.P. et al. Phylogeny of gammaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 9, p. 2305-2314, 2010.

WU, Z et al. Root colonization of encapsulated *Klebsiella oxytoca* Rs-5 on cotton plants and its promoting growth performance under salinity stress. *European Journal of Soil Biology*, v. 60, p. 81-87, 2014.

XIE, W.Y. et al. Cadmium accumulation in the rootless macrophyte *Wolffia globosa* and its potential for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, v. 15, n. 4, p. 385-397, 2013.

XU, P.; QIAO, K.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 114, n. 7, p. 1521-1530, 2017.

XUN, F. et al. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 1, p. 598-608, 2015.

YARO, A.S.; AL-HASSANI, M.H.; RASHEED, H.A.K. Copper biosorption using local Iraqi natural agents. *Desalination and Water Treatment*, v. 54, n. 2, p. 533-539, 2015.

YOU, Y.H. et al. Diversity of endophytic fungi associated with the roots of four aquatic plants inhabiting two wetlands in Korea. *Mycobiology*, v. 43, n. 3, p. 231-238, 2015.

ZAHRAN, H.H. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, v. 25, n. 3, p. 211-223, 1997.

ZHANG, J. et al. Comparisons of microbial abundance and community among different plant species in constructed wetlands in summer. *Ecological Engineering*, v. 82, p. 376-380, 2015.

ZHANG, J. et al. Effects of emergent aquatic plants on abundance and community structure of ammonia-oxidising microorganisms. *Ecological Engineering*, v. 81, p. 504-513, 2015.

CAPÍTULO 2

INOCULAÇÃO DE *Yarrowia lipolytica* PROMOVE O CRESCIMENTO DE *Salvinia auriculata* E REDUZ ESTRESSE CAUSADO POR COBRE

RESUMO

A biorremediação é uma estratégia sustentável para remover ou imobilizar metais do ambiente aquático, incluindo o cobre (Cu). Neste sentido, espécies de plantas do gênero *Salvinia* são indicadas para remediação de metais devido sua capacidade de acumular Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Fe e Cu do ambiente aquático. A eficiência desse processo pode ser melhorada pela interação das plantas aquáticas com microrganismos promotores do crescimento vegetal, que podem proteger os tecidos vegetais do estresse causado pelo metal. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da inoculação da levedura *Yarrowia lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F em *Salvinia auriculata* quanto ao crescimento da planta e a remoção de Cu da solução. Foi observado que a presença da levedura aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) o peso fresco (11,5%); o peso seco (7,1%); o teor de clorofila a, e carotenóides (20,9% e 15,7%, respectivamente); e de nutrientes (22,7% para N, 26,7% para P, 26,7% para S, 29,4% para K, 19,2% para Ca, 28,8% para Mg, 29,5% para Mn, 16,8% para Cu e 19,2% para Zn) na planta após 4 dias de inoculação, em casa de vegetação. No experimento de remoção de cobre, a levedura minimizou os efeitos negativos causados pelo metal nas células vegetais após 8 dias de inoculação. Plantas inoculadas com *Y. lipolytica* e transferidas para solução de cobre apresentaram aumento significativo ($p \leq 0,05$) de peso fresco (28,1%); de peso seco (26,3%); de teor de clorofila a (22,9%) e clorofila b (27,7%), se comparado as plantas não inoculadas sob estresse. Além disso, esta interação minimizou os efeitos negativos causados pelo metal nas células vegetais, apresentando menor percentual de extravasamento de eletrólitos. Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito da inoculação de *Y. lipolytica* em *S. auriculata*. A partir dos resultados obtidos, foi possível obter uma levedura candidata a inoculante em sistemas de tratamento de efluentes do tipo *wetland*, que pode tornar o processo mais eficiente para remoção de metais do ambiente aquático.

Palavras-chaves: Planta aquática, promoção do crescimento vegetal, fitorremediação, absorção de nutrientes, tratamento de efluentes, bioinoculante

1 Introdução

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial, que atua como cofator de diversas enzimas (Gaetke & Chow, 2003). Devido a suas propriedades metálicas apresenta diversas aplicações na indústria e também é utilizado como fungicida no controle de doenças de plantas. Entretanto, em excesso, esse metal se liga a biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, independentemente do seu estado de valência, causando desbalanço iônico (Altimira et al., 2012). Por isso, o aumento da disponibilidade de Cu no ambiente é um problema, sendo necessário o controle de seu despejo nos corpos hídricos (Abraham et al., 2017) e a remoção do excesso desse elemento, pois os íons metálicos não são degradáveis e se acumulam na cadeia trófica, alcançando microrganismos, plantas, animais e os seres humanos (Díez et al., 2017).

Neste sentido, a biorremediação destaca-se como uma estratégia sustentável para remover ou imobilizar metais do ambiente aquático, utilizando plantas e a comunidade microbiana. Essa técnica é alternativa aos processos tradicionais, apresentando menores custos econômicos e ambientais (Mani & Kumar, 2014). Sua aplicação oferece tratamento a efluentes domésticos e industriais, minimizando os impactos negativos das atividades antrópicas. Para isso, as plantas fitorremediadoras devem ser capazes de absorver, acumular ou transformar os contaminantes, produzindo o maior volume de biomassa possível (Zhang et al., 2010).

Plantas aquáticas flutuantes pertencentes ao gênero *Salvinia* (Salvinaceae) possuem alta taxa de crescimento e tolerância a metais, por isso são indicadas para remoção de contaminantes da água (Rezania et al., 2016). *Salvinia minina* é capaz de acumular chumbo, cádmio, níquel e zinco (Iha & Bianchini Jr., 2015). *Salvinia natans* pode acumular cromo, ferro, níquel, chumbo e cádmio (Dhir et al., 2011). As espécies *Salvinia biloba*, *Salvinia cucullata* e *Salvinia auriculata* são resistentes a cobre e capazes de acumular esse metal (Bizzo et al., 2014; Das & Goswami, 2016; Freitas et al., 2016; Panfili et al., 2017).

Embora as plantas aquáticas tenham mecanismos de adaptação para resistir a contaminantes e até mesmo absorvê-los, a interação com microrganismos pode melhorar a fisiologia das plantas sob estresse. Neste sentido, a inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal exerce efeitos benéficos nessas

plantas, através da i) fixação biológica de nitrogênio, ii) solubilização de minerais, iii) produção de fitormônios, e iv) resistência a metais (Srivastava et al., 2016). Foi demonstrado que a bioaugmentação de uma comunidade de bactérias endofíticas não identificadas em *S. minima* reduziu a concentração de Cu, Zn, Cr, Ni, Cd e Pb na solução (Lindell et al., 2016). Entretanto, os microrganismos utilizados para biorremediação não devem apresentar potencial patogênico, sendo necessário conhecer e estudar a microbiota utilizada como bioinoculante (Bashan et al., 2014).

Recentemente, nós isolamos e identificamos 40 microrganismos associados com *Typha domingensis* que apresentaram características de promoção do crescimento vegetal e resistência a cobre. *Yarrowia lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F destacou-se pela capacidade de produzir indóis, solubilizar fosfato e apresentar alta resistência a Cu (22 mmol L⁻¹ em cultivo sólido e a 7,5 mmol L⁻¹ em cultivo líquido). *Y. lipolytica* é uma levedura não patogênica, com elevado potencial biotecnológico, pois possui capacidade de biossorção de metais (Ni²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺) (Dil et al., 2017; Wierzba, 2017), de degradação de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (Khilyas et al., 2017) e de compostos orgânicos presentes no petróleo bruto e fenóis (Darvishi et al., 2017).

Trabalhos recentes comprovam a eficácia da inoculação de bactérias e fungos para promoção do crescimento de plantas aquáticas e remoção de metais da água (Almeida et al., 2015; Saha et al., 2016; Irawati et al., 2017). Assim, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da inoculação da levedura *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F na promoção do crescimento de *S. auriculata* e no processo de remoção de Cu da solução.

2 Materiais e métodos

2.1 Cultivo de *S. auriculata*

S. auriculata foi obtida na Lagoa do Jacú, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, entre 21°43'10.49"S e 41°19'49.68"W, em 2013. Desde então, as plantas foram cultivadas em solução de Hoagland (composição em mmol L⁻¹: 6 KNO₃; 4Ca(NO₃)₂.4H₂O; 2 NH₄H₂PO₄; 1 MgSO₄.7H₂O; 0,021 FeEDTA; 0,05 KCl; 0,25 H₃BO₃; 0,002 MnSO₄.H₂O; 0,002 ZnSO₄.7H₂O; 0,0005 CuSO₄.5H₂O; 0,0005 Na₂MoO₄.2H₂O) (Hoagland & Arnold, 1950) com ¼ da força iônica, pH 6,0 ± 0,2, em casa de vegetação. Para os ensaios, as plantas foram aclimatadas por 7 dias nas

condições descritas anteriormente em solução nutritiva, selecionando-se indivíduos adultos saudáveis para a experimentação (Bizzo et al., 2014).

2.2 Preparo do inoculo e do metal

Y. lipolytica UENF-4.2.5.0.X-F foi cultivada em meio DIGS (composição em g L⁻¹: 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 1,5 ácido glutâmico; 2,0 ácido málico), em pH 6,0, sob agitação constante de 175 rpm, a 30 °C. O inoculo microbiano, correspondente a 1 x 10⁷ células, em 1 mL de suspensão celular, foi adicionado a solução nutritiva nos vasos contendo *S. auriculata*. A solução de 0,01 mmol L⁻¹ de CuCl₂ foi preparada segundo Bizzo et al. (2014).

2.3 Ensaios de interação planta e microrganismo

Para avaliar o potencial de promoção do crescimento de *Y. lipolytica*, a unidade experimental foi composta por 1 g de planta inoculada em vasos contendo 500 mL de solução de Hoagland a ¼ da força iônica e mantidas em casa de vegetação por 4 dias (Plantas + YL). A condição controle (Planta) não recebeu adição do inóculo. Para avaliar a capacidade da levedura de reduzir o estresse causado por cobre em *S. auriculata*, foi montado um novo ensaio e após os 4 dias de inoculação, as plantas foram transferidas para uma nova solução contaminada com 0,01mmol L⁻¹ de CuCl₂, por um período de mais 4 dias. Dessa forma, após um total de 8 dias em casa de vegetação, as seguintes condições foram avaliadas: Planta; Planta + YL; Planta + Cu; Planta + YL + Cu. Foram realizados três experimentos independentes para ambos os ensaios, conduzidos em delineamento inteiramente casualizado contendo cinco repetições.

2.4 Desenvolvimento de *S. auriculata*

O peso fresco (PF) das plantas foi medido ao final de cada experimento. Para a determinação do peso seco (PS), as amostras foram secas a 60 °C por 96 h. O conteúdo de água das plantas (CA mL g⁻¹ PS) foi estimado usando a equação: CA = (PF - PS) / PS.

2.5 Determinação de pigmentos fotossintéticos

A concentração de clorofilas (*a* e *b*) e carotenóides foi determinada de acordo com Wellburn (1994) para ambos os ensaios de promoção do crescimento vegetal e remoção de Cu. Para tanto, após o período em casa de vegetação, as plantas de *S. auriculata* (50 mg de PF) foram colocadas em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como solvente orgânico e mantidas no escuro, por 96 h. O extrato foi determinado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm.

2.6 Extravasamento de eletrólitos

O extravasamento de eletrólitos, íons presentes no meio intracelular, foi determinado como descrito por Hamed et al. (2007), sendo utilizado para inferir possíveis danos de membrana nas plantas sob estresse por cobre. Brevemente, as plantas de *S. auriculata* (300 mg PF) foram incubadas em 25 mL de água ultra-pura. As amostras foram mantidas em banho-maria a 25 °C por 3 h e depois a condutividade elétrica inicial (CE_1) foi mensurada. Então, as amostras foram aquecidas por 20 min a 96 °C para liberação de todos os eletrólitos. Após o resfriamento, a condutividade elétrica final (CE_2) foi verificada. O percentual de extravasamento de eletrólitos (EE) foi calculado de acordo com a equação: $EE = (CE_1/CE_2) \times 100$.

2.7 Determinação do teor de nutrientes nas plantas

Para determinação de nutrientes um ensaio independente foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo cinco repetições, em que 2 g de planta foram incubadas em vasos contendo 1000 mL de solução de Hoagland a $\frac{1}{4}$ da força iônica. A concentração de inóculo (1×10^7 células mL⁻¹) e de Cu (0,01 mmol L⁻¹) foram mantidas para os ensaios de promoção do crescimento vegetal e remoção de cobre. Para quantificar N, o material vegetal (0,1 g PS) foi submetido à digestão sulfúrica, e o extrato lido a 480 nm, por espectrofotometria pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Os demais nutrientes: P, K, S, Ca, Mg, B, Zn, Mn, Mo e Cu foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta de 0,1 g de PS de planta (Tsujii

et al., 2017). O conteúdo dos nutrientes nas plantas foi calculado com base no PS total de amostra vegetal, em cada vaso, corresponde a sua unidade experimental.

2.8 Análises estatísticas

Os dados do ensaio de promoção do crescimento vegetal foram analisados pelo Teste t ($p \leq 0,05$). Os dados do ensaio de remoção de Cu e análise do conteúdo de nutrientes foram analisados por ANOVA ($p \leq 0,05$), seguido pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), a fim de determinar as diferenças entre as condições testadas. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism, versão 5.0.

3 Resultados e discussão

3.1 *Y. lipolytica* promove o crescimento de *S. auriculata*

O potencial de *Y. lipolytica* para promover o crescimento vegetal foi demonstrado em *S. auriculata*. As plantas inoculadas (Planta + YL) com essa levedura apresentaram um incremento significativo de 11,5% no PF (Fig. 1A) e 7,1% no PS (Fig. 1B), após 4 dias de incubação. Porém não houve diferença no conteúdo de água, se comparado às plantas não inoculadas (Planta) (Fig. 1C). Logo, o ganho de biomassa se deu por maior fixação de carbono, o que é corroborado pelo aumento significativo no teor de clorofila a (20,9%) e carotenóides (15,7%) (Fig. 1D) nas plantas inoculadas. Esses resultados comprovam que *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F promove incremento de biomassa em *S. auriculata* na condição testada.

A *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F foi descrita como promotora do crescimento vegetal, pois é capaz de produzir compostos indólicos e solubilizar fosfato. Cogo et al. (2018) demonstraram a produção de auxinas em outra cepa dessa levedura. Da mesma forma, Vassileva et al. (2000) descreveram essa espécie como solubilizadora de fosfato inorgânico (Vassileva et al., 2000). Sua aplicação como inoculante associada ao fungo micorriza *Glomus deserticola* em tomate, aumentou o PS e a absorção de fósforo solúvel (Vassilev et al., 2001).

Entretanto, a inoculação de microrganismos em plantas aquáticas ainda é uma estratégia pouco abordada em processos de biorremediação, visando o ganho de biomassa para aumento de eficiência no tratamento de efluentes. Os poucos estudos que trazem essa questão utilizam, na sua maioria, a associação entre

bactérias e plantas (Tsuji et al., 2017). Porém, os fungos também são capazes de promover o crescimento vegetal (Fu et al., 2016). Fungos micorrízicos arbusculares, fungos negros e leveduras são encontrados em associação com várias famílias de plantas aquáticas, incluindo a Salviniales (Almeida et al., 2015; Marins et al., 2017). Entre os benefícios trazidos ao hospedeiro está à melhora na absorção de nutrientes pelas plantas, que é possível devido à produção de fitormônios e a solubilização de minerais pelos fungos (Kumla et al., 2014). Além disso, a inoculação de leveduras em plantas pode aumentar a absorção de metais pelo vegetal e reduzir o estresse causado por estes contaminantes (Deng et al., 2012; Ramos-Garza et al., 2015).

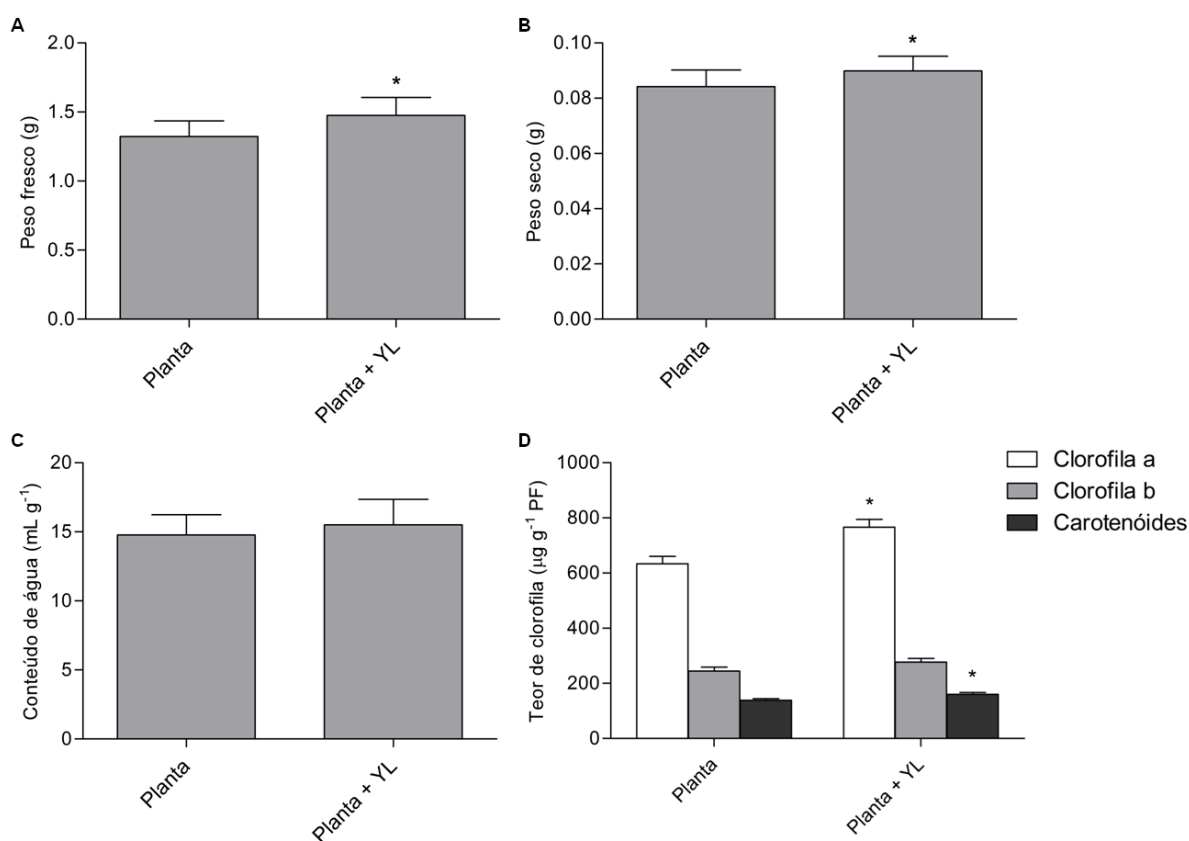


Figura 1: Efeito da inoculação de *Y. lipolytica* em *S. auriculata*. A levedura promoveu aumento de peso fresco (A) e peso seco (B), entretanto não afetou a conteúdo de água (C) pelas plantas. Além disso, houve aumento do teor de clorofila a e carotenóides (D), segundo o Teste t ($p \leq 0,05$)*. YL: *Yarrowia lipolytica*, PF: peso fresco.

3.2 *Y. lipolytica* protege *S. auriculata* do estresse causado por cobre

No intuito de verificar o efeito de *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F em *S. auriculata* na presença de Cu, plantas previamente inoculadas com a levedura foram transferidas para uma nova solução contaminada com Cu. Como pode ser observado na Figura 2A e 2B, na condição Planta + YL houve incremento de biomassa de 21,4% de PF e 4,2% de PS, corroborando os dados obtidos no experimento anterior e mostrando que o ganho pode ser superior ao encontrado, se avaliado um período de maior tempo. Já o tratamento contendo 0,01 mmol L⁻¹ de CuCl₂ (Planta + Cu) reduziu significativamente o PF(12,6%) e o PS (15,1%) quando comparado ao controle (Planta).

Por outro lado, as plantas previamente inoculadas com a levedura e transferidas para solução contendo o metal (Planta + YL + Cu) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle não inoculado (Planta) para PF e PS, resultado igual ao encontrado no tratamento Planta + YL. Comparado ao tratamento Planta + Cu, a levedura promoveu aumento de 28,1% de PF e 26,3% no PS, o que mostra o efeito protetor da levedura sobre a planta em condição de estresse por metal (Fig. 2A e 2B).

Panfili et al. (2017) demonstraram que 0,01 mmol L⁻¹ de Cu inibe em 15,6% a produção de novas folhas em *S. auriculata* após 7 dias de estresse. Este resultado está de acordo com a redução do PF e PS observada no presente estudo. Em *Salvinia natans* a concentração de 8 mmol L⁻¹ de CuSO₄ reduz sua biomassa em 45,1%, após 28 dias de ensaio (Barros & Henares, 2015). Em *Salvinia molesta*, 60 mmol L⁻¹ reduz o nível de proteínas totais na biomassa seca, após 10 dias de experimentação (Holtra et al., 2015). Desta forma, é possível verificar que a toxidez de Cu em *Salvinia* está associada com a concentração do metal na solução e o período de exposição.

Recentemente, Ndeddy Aka e Babalola (2016) identificaram *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* e *Bacillus subtilis*, positivas para produção de AIA, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e resistentes a Ni, Cr e Cd. A inoculaçãodessas bactérias simultaneamente em *Brassica juncea* aumentou significativamente o comprimento da raiz (40,3%), a altura da planta (31,4%), oPF (30,7%) e o PS (16%) na presença de0,1 mmol L⁻¹ de Ni, Cr e Cd . A inoculação de *Pseudomonas brassicacearum* e *Rhizobium leguminosarum* promotoras do

crescimento vegetal também atenuaram a toxicidade do excesso de Zn em *Brassica juncea* (Adediram et al., 2015). Efeitos semelhantes foram encontrados em nosso estudo, comprovando que a inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal resistentes a metais protege as plantas aquáticas contra os efeitos danosos desses contaminantes, promovendo o crescimento vegetal mesmo em condições de estresse.

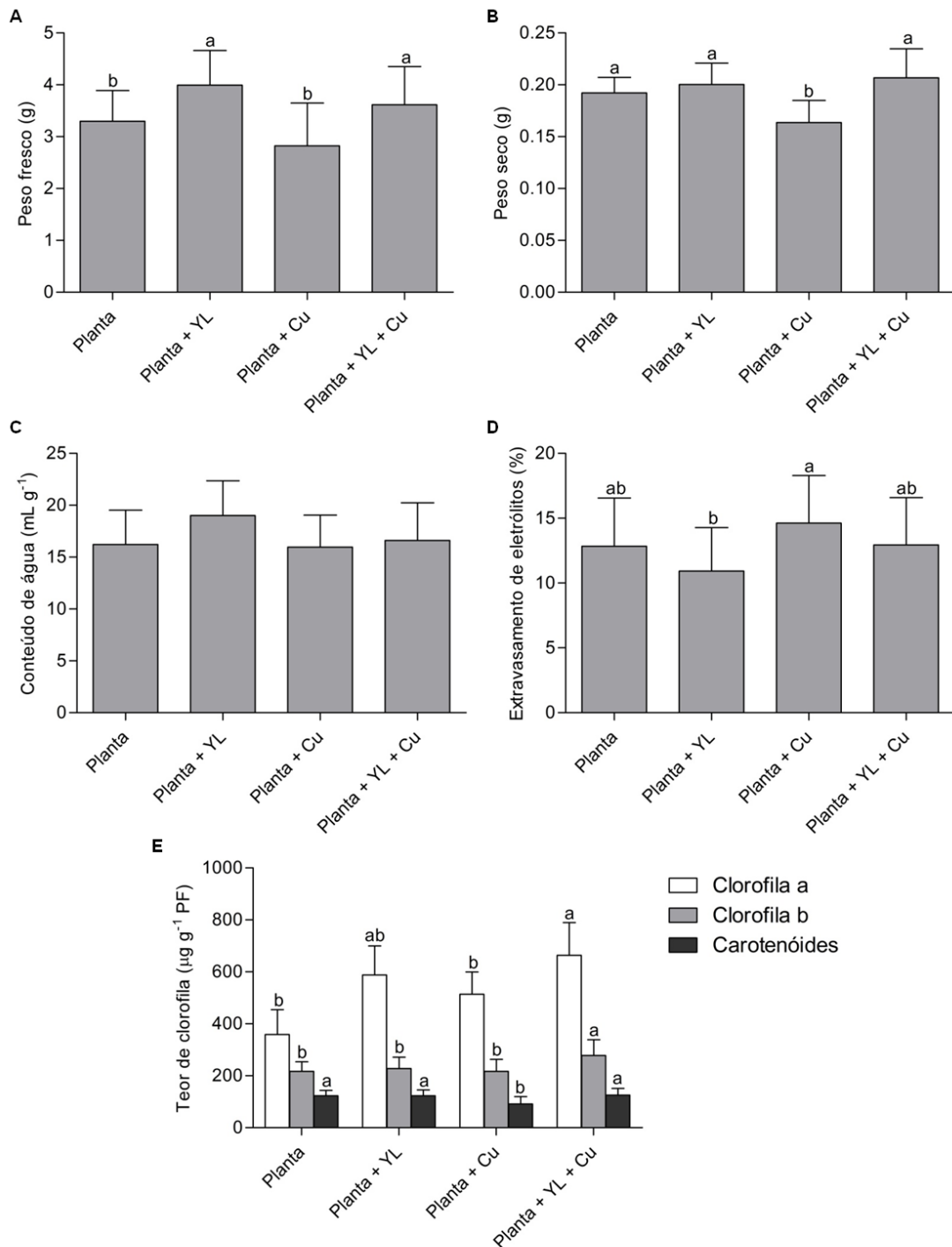


Figura 2: Efeito protetor da inoculação prévia de *Y. lipolytica* em *S. auriculata* em estresse por cobre. *Yarrowia lipolytica* (YL) promoveu aumento de peso fresco (A) e peso seco (B) na presença e ausência de cobre (Cu). A inoculação da levedura não aumentou o conteúdo de água na ausência do metal (C), reduziu o dano oxidativo causado pelo Cu nas membranas celulares representado pelo extravasamento de eletrólitos (D) e aumentou o teor de clorofila (E) nas plantas. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si na mesma análise, segundo o Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Foi verificado que a presença do metal aumentou (13,9%) o extravasamento de eletrólitos no tratamento Planta + Cu. Esse percentual foi menor na presença da

levedura (Planta + YL + Cu), retornando aos valores observados na condição controle (Planta) (Fig. 2D). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Bizzo et al. (2014), que demonstrou aumento de 17% no extravasamento de eletrólitos em *S. auriculata* sob estresse de 0,01 mmol L⁻¹ de Cu, após 2 dias de ensaio. Das & Goswami, (2016) demonstraram que a exposição de *S. cucullata* a 12 mmol L⁻¹ de Cu aumenta significativamente a peroxidação lipídica em 250% na raiz e 245% nas folhas, avaliada através do conteúdo de malonaldeído (MDA). Concomitantemente, ocorre uma redução de 56,3% das proteínas solúveis na raiz e na folha das plantas (Das & Goswami, 2016). Já foi descrito que o aumento da produção de ROS em resposta ao estresse por metais provoca a peroxidação de lipídeos de membrana e aumento do extravasamento de eletrólitos (Bajji et al., 2001). Dessa forma, é possível que *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F atue reduzindo o dano oxidativo causado pelo Cu nas plantas de *S. auriculata*. Entretanto, seria interessante avaliar o conteúdo de MDA e as proteínas solúveis nestas condições para confirmação dessa hipótese.

Não houve redução no teor de clorofilas a, b e carotenóides no tratamento Planta + Cu. Bizzo et al. (2014) também não observaram diferenças significativas em condições semelhantes. Entretanto, houve aumento significativo no teor de clorofila a (22,9%) e clorofila b (27,7%) nas plantas previamente inoculadas com *Y. lipolytica* UENF-4.2.5.0.X.F e transferidas para solução com 0,01 mmol L⁻¹ de CuCl₂ (Fig. 2E). Assim, da mesma forma que no ensaio de promoção do crescimento, a inoculação da levedura aumentou o teor desses pigmentos, inclusive na presença do metal, o que justifica o incremento de PS (Fig. 2B). Somado a isso, os carotenóides são um tipo de pigmento fotossintético acessório que também atua como molécula antioxidante, portanto maiores concentrações de carotenóides nos cloroplastos devem proteger os PSI e PSII contra danos oxidativos causados pelo estresse com metal (Prado et al., 2016).

3.3 *Y. lipolytica* aumenta a absorção de nutrientes por *S. auriculata*

Ao quantificar os nutrientes na planta após 4 dias de inoculação, foi possível determinar que a levedura aumentou de maneira significativa ($p \leq 0,05$) a absorção de macro e micronutrientes, utilizados para ganho de biomassa. O percentual de aumento foi de 22,7% para N, 26,7% para P, 26,7% para S, 29,4% para K, 19,2%

para Ca, 28,8% para Mg, 29,5% para Mn, 16,8% para Cu e 19,2% para Zn nas plantas inoculadas, após 4 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito da inoculação de *Y. lipolytica* na absorção de nutriente em *S. auriculata* após 4 dias.

	Planta	Planta + YL
Macronutrientes (mg vaso⁻¹)		
N	9,49 ± 0,24	11,65 ± 0,39 *
P	2,44 ± 0,04	3,10 ± 0,13 *
S	0,91 ± 0,03	1,15 ± 0,04 *
K	8,83 ± 0,27	11,42 ± 0,40 *
Ca	0,67 ± 0,02	0,79 ± 0,04 *
Mg	0,62 ± 0,01	0,80 ± 0,03 *
Micronutrientes (µg vaso⁻¹)		
Mn	4,23 ± 0,12	5,48 ± 0,21 *
B	16,99 ± 2,24	19,61 ± 5,26
Cu	3,67 ± 0,11	4,29 ± 0,24 *
Zn	15,37 ± 0,52	18,83 ± 0,55 *
Mo	7,74 ± 0,25	8,42 ± 0,31

Médias significativamente diferentes (*), segundo o Teste t ($p \leq 0,05$). YL: *Yarrowia lipolytica*

Após 8 dias, da mesma forma, o conteúdo de P, S, K, Ca, Mg, Mn, e Zn permaneceram significativamente maiores nas plantas com *Y. lipolytica*, se comparado ao controle (Tabela 2). Por isso, é possível afirmar que o efeito da levedura na promoção do crescimento de *S. auriculata* se mantém ao longo do tempo. Em contrapartida, plantas não inoculadas e mantidas em solução contendo em 0,01 mmol L⁻¹ de CuCl₂ apresentaram redução significativa na absorção de S (16%)K (27,1%) e Mn (15,8%) (Tabela 2). No presente trabalho, as plantas inoculadas e transferidas para solução com Cu (Planta + YL + Cu) apresentaram teores de macro e micronutrientes iguais ou superiores às plantas da condição controle (Planta) como pode ser observado na Tabela 2. O ganho de biomassa com aumento da absorção de macro e micronutrientes é mantido mesmo na presença do contaminante metálico. Resultados semelhantes também foram descritos em fungos ectomicorrízicos (Kumla et al., 2014).

Tabela 2: Efeito da inoculação de *Y. lipolytica* na absorção de nutriente em *S. auriculata*, após 8 dias.

	Planta	Planta + YL	Planta + Cu	Planta + YL + Cu
Macronutrientes (mg vaso⁻¹)				
N	23,33 ± 2,95 ^{ab}	25,95 ± 0,95 ^a	20,41 ± 1,32 ^b	21,00 ± 0,32 ^b
P	6,18 ± 0,95 ^b	7,90 ± 0,34 ^a	5,19 ± 0,86 ^b	6,39 ± 0,28 ^b
S	2,66 ± 0,34 ^b	3,46 ± 0,14 ^a	2,33 ± 0,30 ^{bc}	2,81 ± 0,11 ^b
K	23,87 ± 3,32 ^b	31,25 ± 2,08 ^a	17,41 ± 2,62 ^c	22,17 ± 1,13 ^b
Ca	1,93 ± 0,30 ^b	2,33 ± 0,26 ^a	1,58 ± 0,15 ^b	1,68 ± 0,10 ^b
Mg	1,13 ± 0,15 ^b	1,42 ± 0,06 ^a	1,23 ± 0,14 ^{ab}	1,41 ± 0,05 ^a
Micronutrientes (µg vaso⁻¹)				
Mn	10,59 ± 1,09 ^b	12,95 ± 0,97 ^a	8,95 ± 0,65 ^{bc}	9,79 ± 0,48 ^b
B	52,34 ± 8,43 ^a	37,19 ± 8,27 ^{ab}	43,89 ± 10,73 ^{ab}	33,10 ± 9,52 ^b
Zn	34,8 ± 4,47 ^b	41,42 ± 1,32 ^a	31,78 ± 2,56 ^b	35,20 ± 1,01 ^b
Mo	14,35 ± 1,88	14,57 ± 0,64	15,75 ± 0,70	14,59 ± 0,75

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si na mesma análise, segundo o Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Oliva et al. (2010) verificaram que o excesso de Cu reduziu as concentrações de K, S, Mg, Mn, B na raiz de *Erica andevalensis*. Segundo estes autores, a redução de K está associada ao aumento dos danos de membrana, devido à perda desse elemento por extravasamento de eletrólitos, assim como que foi observado em *S. auriculata* na presença de Cu. Em *Lolium perenne*, 0,2 mmol L⁻¹ de CuCl₂ também provocou redução significativa de K (62,7%), Mg (14,9%), Fe (36,8%) e Zn (27,1%). Considerando-se que os Mg, Fe e Zn contribuem para a síntese de clorofilas, a sua redução está associada a prejuízos no processo de fotossíntese (Dong et al., 2013).

3.4 Remoção de cobre pela interação de *Y. lipolytica* e *S. auriculata*

A concentração de Cu foi determinada na solução antes e depois de receber as plantas nas condições testadas. Como pode ser observado na Figura 3A, a concentração de Cu utilizada (0,01 mmol L⁻¹) equivale a 635 µg L⁻¹ de Cu. Nesta situação é evidente a capacidade de *S. auriculata* de acumular Cu, em que as plantas retiraram 22,6% do metal da solução. Todavia, não houve diferença significativa na remoção de Cu da solução entre as condições não inoculado (Planta + Cu) e inoculado com *Y. lipolytica* (Planta + YL + Cu)(Fig. 3A).

Na Figura 3B, é possível observar o conteúdo de Cu nas plantas tratadas. Nos tratamentos onde foi adicionado 0,01 mmol L⁻¹ de CuCl₂, não houve diferença significativa na absorção de Cu pelas plantas incubadas na solução (Planta + Cu), se comparado as plantas inoculadas e incubadas na presença do metal (Planta + YL+ Cu). Nessas condições o conteúdo de Cu foi de 164,94 e 183, 89 µg,

respectivamente (Fig. 3B). Ainda assim, há uma forte tendência no aumento de Cu nas plantas inoculadas com *Y. lipolytica*, equivalente a 11,5%, o que em termo de absorção é bastante substancial. Marchand et al. (2017) também obtiveram maiores percentuais de remoção de cobre em áreas plantadas com macrófitas se comparado a áreas não plantadas. Esses percentuais são maiores em áreas onde há formação de biofilme microbiano. Entretanto, não houve diferença significativa na remoção desse metal, segundo o índice de eficiência relativo ao tratamento (Marchand et al., 2017). Dessa forma, ainda que estatisticamente não apresente diferenças, como a levedura aumenta a biomassa de *S. auriculata* e reduz o estresse causado por Cu, pode haver aumento da absorção desse metal. No futuro, isso pode ser contornado realizando um número maior de repetições do experimento.

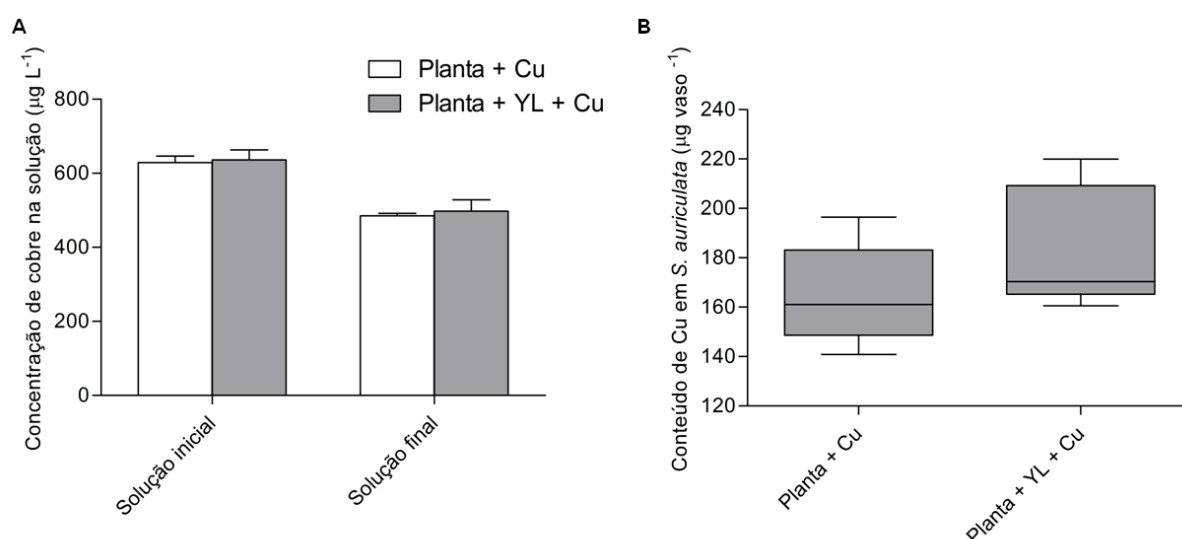


Figura 3: Efeito de *Y. lipolytica* na remoção de cobre da solução (A) e absorção por *S. auriculata* (B). Não houve diferença significativa na remoção de cobre da solução entre a condição não inoculada (Planta + Cu) e inoculada (Planta + YL + Cu), segundo o Teste t ($p \leq 0,05$).

Frequentemente, plantas do gênero *Salvinia* têm sido avaliadas para fitorremediação de cobre. Foi demonstrado que *Salvinia cucullata* é capaz de acumular 3,8 mg g⁻¹ de Cu em seus tecidos, quando exposta a 30 mg L⁻¹ desse metal por um período de 21 dias (Das & Goswani, 2016). *Salvinia molesta* exposta a 8 mg L⁻¹ de Cu por 14 dias, absorveu 6,2 mg g⁻¹ do metal (Barros & Henares, 2015). *Salvinia natans* é capaz de acumular 40 vezes o teor de Cu em comparação a

amostra controle, sem adição de metal na solução, correspondente a 19 mg g^{-1} de Cu em peso seco, ao final de 14 dias (Holtra et al., 2014). *Salvinia biloba* testada para $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu foi capaz de absorver $814 \mu\text{g g}^{-1}$, também após 14 dias (Freitas et al., 2018). Porém, tem sido descrito que a acumulação de metais ocorre majoritariamente nas primeiras 24 e 48 h de incubação com o metal (Miretzky et al., 2004, Panfili et al., 2017). Esta característica é relevante para o uso de *Salvinia* em técnicas de fitorremediação, pois quanto menor o tempo necessário para remoção de metais, mais eficiente o processo (Miretzky et al., 2004, Panfili et al., 2017).

Desta forma, a adição de um bionoculante tem elevado potencial para obter essa resposta de forma mais rápida, e portanto, mais produtiva. Contudo, este é o primeiro estudo que avaliou o efeito da inoculação de um microrganismo, *Y. lipolytica*, em *S. auriculata* visando à promoção do crescimento e fitorremediação. São necessários novos estudos para aprimorar o processo, mas os resultados apresentados mostram que o uso dessa associação é uma estratégia promissora e sustentável para a remediação de ambientes contaminados.

4 Conclusão

A inoculação de *Y. lipolytica* promove o crescimento de *S. auriculata*, com ganho de PF e PS, aumento do teor de clorofila a, b e carotenóide, e aumento do conteúdo de N, P, S, K, Ca, Mg, Zn, Cu e Mn. Essa associação também protege as plantas da toxidez do Cu, reduzindo o estresse causado por esse metal nas células vegetais, medido pelo percentual de extravasamento de eletrólitos. Assim, foi selecionada uma levedura promissora para o desenvolvimento de um bioinoculante aplicável a remoção de metais em estações de tratamento de efluentes.

Referências

ABRAHAM, M.R.; SUSAN, T.B. Water contamination with heavy metals and trace elements from Kilembe copper mine and tailing sites in Western Uganda; implications for domestic water quality. *Chemosphere*, v. 169, p. 281-287, 2017.

ADEDIRAN, G.A. et al. Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 490-499, 2015.

ALMEIDA, T.T. et al. 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*, v. 14, n. 2, p. 4920-4931, 2015.

ALTIMIRA, F. et al. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 193, 2012.

BAJJI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, v. 36, n. 1, p. 61-70, 2002.

BARROS, J.P.A.A.; HENARES, M.N.P. Biomass reduction of *Salvinia molesta* exposed to copper sulfate pentahydrate (CuSO₄. 5H₂O). *Revista Ambiente & Água*, v. 10, n. 3, p. 520-529, 2015.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BIZZO, A.L.T. et al. Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 26, n. 3, p. 268-277, 2014.

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

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

DAS, S.; GOSWAMI, S. Copper phytoextraction by *Salvinia cucullata*: biochemical and morphological study. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 2, p. 1363-1371, 2017.

DENG, Z. et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapes (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 223, n. 8, p. 5321-5329, 2012.

DHIR, B. et al. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 6, p. 1678-1684, 2011.

DÍEZ, E.G. et al. High-resolution reconstruction of the 20th century history of trace metals, major elements, and organic matter in sediments in a contaminated area of Lake Geneva, Switzerland. *Applied Geochemistry*, v. 78, p. 1-11, 2017.

DIL, E.A. et al. Highly efficient simultaneous biosorption of Hg²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ by Live yeast *Yarrowia lipolytica* 70562 following response surface methodology optimization: Kinetic and isotherm study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 48, p. 162-172, 2017.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa Agrobiologia- Documentos (INFOTECA-E), 1999.

DONG, Y. et al. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. *Journal of Plant Interactions*, v. 9, n. 1, p. 402-411, 2014.

FREITAS, F. et al. Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). *Brazilian Journal of Biology*, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

FU, S.F. et al. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology*, v. 120, n. 3, p. 433-448, 2016.

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, v. 189, n. 1-2, p. 147-163, 2003.

HAMED, K.B. et al. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*, v. 53, n. 3, p. 185-194, 2007.

HOAGLAND, D.R. et al. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HOLTRA, A.N.N.A.; ZAMORSKA-WOJDYŁA, D. Assessment of the physiological condition of *Salvinia natans* L. exposed to copper (II) ions. *Environment Protection Engineering*, v. 41, n. 3, 2015.

HOLTRA, A.N.N.A.; ZAMORSKA-WOJDYŁA, D. Bioaccumulation capacities of copper (II) ions in *Salvinia natans*. *Environment Protection Engineering*, v. 40, n. 4, 2014.

IHA, D.S.; BIANCHINI JR, I. Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. *International Journal of Phytoremediation*, v. 17, n. 10, p. 929-935, 2015.

IRAWATI, W. et al. The Role of Heavy Metals-Resistant Bacteria *Acinetobacter* sp. in Copper Phytoremediation using *Eichhornia crasippes* [(Mart.) Solms]. *KnE Life Sciences*, v. 3, n. 5, p. 208-220, 2017.

JACKSON, M.L. Soil chemical analysis. New Jersey: Prentice Hall, p.489, 1965.

KHILYAS, I.V.; LOCHNIT, G.; ILINSKAYA, O.N. Proteomic analysis of 2, 4, 6-trinitrotoluene degrading yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 2600, 2017.

KUMLA, J. et al. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 707-720, 2014.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016.

LINDELL, A.H.; TUCKFIELD, R.C.; MCARTHUR, J.V. Differences in the Effect of Coal Pile Runoff (Low pH, High Metal Concentrations) Versus Natural Carolina Bay Water (Low pH, Low Metal Concentrations) on Plant Condition and Associated Bacterial Epiphytes of *Salvinia minima*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 96, n. 5, p. 602-607, 2016.

MANI, D.; KUMAR, C. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 11, n. 3, p. 843-872, 2014.

MARINS, J.F.; CARRENHO, R. Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in plants associated with aquatic environments. *Acta Botanica Brasilica*, v. 31, n. 2, p. 295-308, 2017.

MARCHAND, L. et al. Copper removal from water using a bio-rack system either unplanted or planted with *Phragmites australis*, *Juncus articulatus* and *Phalaris arundinacea*. *Ecological engineering*, v. 64, p. 291-300, 2014.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A.F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*, v. 57, n. 8, p. 997-1005, 2004.

NDEDDY AKA, R.J.; BABALOLA, O.O. Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, v. 18, n. 2, p. 200-209, 2016.

OLIVA, S.R. et al. Uptake, localization and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. *Plant and soil*, v. 328, n. 1-2, p. 411-420, 2010.

PANFILI, I. et al. Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. *Science of The Total Environment*, v. 601, p. 1263-1270, 2017.

PRADO, C. et al. Differential effects of Cr (VI) on the ultrastructure of chloroplast and plasma membrane of *Salvinia minima* growing in summer and winter. Relationships with lipid peroxidation, electrolyte leakage, photosynthetic pigments, and carbohydrates. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 2, p. 8, 2015.

RAMOS-GARZA, J. et al. Isolation and characterization of yeasts associated with plants growing in heavy-metal-and arsenic-contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 307-319, 2015.

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

SAHA, C. et al. A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. *Plant Biology*, v. 18, n. 6, p. 938-946, 2016.

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

STOUT, L.; NÜSSLEIN, K. Biotechnological potential of aquatic plant–microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 339-345, 2010.

TSUJI, K. et al. Mn accumulation in a submerged plant *Egeria densa* (Hydrocharitaceae) is mediated by epiphytic bacteria. *Plant, Cell & Environment*, v. 40, n. 7, p. 1163-1173, 2017.

VASSILEV, N. et al. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil–plant system. *Journal of Biotechnology*, v. 91, n. 2-3, p. 237-242, 2001.

VASSILEVA, M. et al. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 7, p. 693-697, 2000.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

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

ZHANG, B.Y.; ZHENG, J.S.; SHARP, R.G. Phytoremediation in engineered wetlands: mechanisms and applications. Procedia Environmental Sciences, v. 2, p. 1315-1325, 2010.