



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO PROCESSO DE BIOSSORÇÃO  
DO COBRE POR *Cunninghamella elegans* - UCP 542**

***PATRÍCIA MENDES DE SOUZA***

RECIFE  
2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO PROCESSO DE BIOSSORÇÃO  
DO COBRE POR *Cunninghamella elegans* - UCP 542**

***PATRÍCIA MENDES DE SOUZA***

RECIFE  
2004

**PATRÍCIA MENDES DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO PROCESSO DE BIODISSORÇÃO  
DO COBRE POR *Cunninghamella elegans* - UCP 542**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA DE FUNGOS DO CENTRO DE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA DE  
FUNGOS.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI**

**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ALINE ELESBÃO DO NASCIMENTO**

RECIFE  
2004

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO PROCESSO DE BIOSSORÇÃO  
DO COBRE POR *Cunninghamella elegans* - UCP 542**

**PATRÍCIA MENDES DE SOUZA**

**ORIENTADORA :**

\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI**

**EXAMINADORES:**

\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA APARECIDA REZENDE**

\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. NEIVA TINTI DE OLIVEIRA**

**SUPLENTE:**

\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação, atenção e pelo apoio no decorrer de todo o trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Elesbão do Nascimento, pela aprendizagem, paciência, atenção, incentivo e amizade durante todos esses anos de convívio e trabalho;

Aos amigos Marcos Lima e Petrusk Homero, pelos momentos de lazer e trabalhos compartilhados desde a Iniciação Científica;

Ao Michel, pelo carinho e atenção durante todo esse tempo em que convivemos juntos;

Aos meus colegas do Mestrado em Biologia de Fungos, pelos momentos compartilhados em especial a amiga Michelle Rose;

Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), pelos momentos de descontração, em especial Mabel Calina;

Aos técnicos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Severino Humberto e Salatiel, pela presteza dos seus serviços;

À Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Reitor Pe. Theodoro Paulo Severino Peters, pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos pela atenção e conhecimentos transmitidos;

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da Bolsa de mestrado, e ao PRONEX e CTPETRO/FINEP pelo apoio financeiro.

**DEDICO**

***Aos meus pais, José Tadeu de Souza e Maria de Lourdes Mendes de Souza e Irmãos, José Tadeu de Souza Filho e Lucas Ricardo Mendes de Souza, pelo apoio, educação, incentivo e amizade.***

## SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1. FUNGOS: CLASSE ZYGOMYCETES.....	5
2.2. GÊNERO <i>Cunninghamella</i> .....	6
2.3. POLIFOSFATO.....	8
2.4 FOSFATASES.....	10
2.5. BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS.....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
3.1. GERAL.....	16
3.2. ESPECÍFICOS.....	16
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
4.1. MICRORGANISMO.....	17
4.2. MEIOS DE CULTURA.....	17
4.2.1. MEIO DE MANUTENÇÃO.....	17
4.2.2.MEIO PARA ESPORULAÇÃO.....	18
4.2.3. MEIO DE CRESCIMENTO.....	18
4.3. SOLUÇÃO METÁLICA.....	19
4.4. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	19
4.4.1.PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	19
4.4.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	19
4.4.3. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	20
4.5. ENSÁIOS BIOQUÍMICOS.....	20

4.5.1. DETERMINAÇÃO DO pH.....	20
4.5.2. DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO INORGÂNICO E GLICOSE.....	21
4.5.3. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE POLIFOSFATO TOTAL.....	21
4.5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA.....	22
4.6. BIODISSORÇÃO DE COBRE.....	23
4.6.1. DETERMINAÇÃO DA REMOÇÃO DO COBRE NO LÍQUIDO METABÓLICO.....	23
4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	23
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO.....	25
5.2. ATIVIDADE FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA.....	31
5.3. BIODISSORÇÃO DE COBRE.....	33
5.4. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS.....	34
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7.CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), cultivada no meio Synthetic Medium for Mucorales SMM, 150 rpm, durante 120 horas : pH do meio (A), Consumo de Glicose (B), Consumo de fosfato (C).....	26
Figura 2. Perfil de crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), cultivada no meio Synthetic Medium for Mucorales SMM em presença do cobre, 150 rpm, durante 120 horas:: pH do meio (A), Consumo de Glicose (B), Consumo de fosfato (C).....	28
Figura 3. Curva de polifosfato relacionada ao crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), cultivada no meio Synthetic Medium for Mucorales, 150 rpm, durante 120 horas de cultivo.....	30
Figura 4. Curva de polifosfato relacionada ao crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), cultivada no meio Synthetic Medium for Mucorales, adicionado de cobre (2mM), 150 rpm, durante 120 horas de cultivo.....	30
Figura 5. Curvas de atividade da fosfatase alcalina no micélio de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), cultivado na presença e ausência de cobre.....	32
Figura 6. Histograma comparativo da atividade da fosfatase alcalina no micélio de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), cultivada na presença e ausência de cobre e o conteúdo de polifosfato ao longo do crescimento.....	33
Figura 7. Concentração de cobre no líquido metabólico ao longo do crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542), no meio Synthetic Medium for Mucorales, adicionado de cobre (2mM), 150 rpm, durante 120 horas de cultivo.....	34
Figura 8. Eletronmicrografias de varredura de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542). A - Amostra Controle; B- Amostra cultivada em presença de cobre. Amostras com 36 horas de cultivo. Clamidósporos ( ★ ); Hifas ( → )......	36

Figura 9. Eletronmicrografias de varredura de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542). A- Amostra Controle; B- Amostra cultivada em presença de cobre. Amostras com 72 horas de cultivo. Clamidósporos ( ★ ); Hifas ( → ).....	37
Figura 10. Eletronmicrografias de varredura de <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542). A- Amostra Controle; B- Amostra cultivada em presença de cobre. Amostras com 120 horas de cultivo. Clamidósporos ( ★ ); Hifas ( → ).....	38

## RESUMO

Considerando o potencial do gênero *Cunninghamella*, o presente trabalho teve como finalidade estabelecer os aspectos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais de *Cunninghamella elegans* cultivada em meio contendo cobre. O perfil de crescimento foi estabelecido em função da biomassa, do consumo de glicose e fosfato, pH do meio, conteúdo de polifosfato, atividade de fosfatases e remoção do metal. Os resultados obtidos indicam a influência do metal sobre o crescimento como observado pelo rendimento da biomassa. O consumo das fontes de carbono e fósforo foi semelhante para a cultura tratada e controle. A análise do perfil de polifosfato permitiu verificar comportamentos distintos na ausência e presença do metal. A análise do polifosfato celular revelou que, nas amostras tratadas, o polímero é significativamente metabolizado durante o início do cultivo pelas amostras tratadas. O isolado analisado não exibiu atividade para a fosfatase ácida. Contudo, o cultivo em presença de cobre induziu variações na expressão da fosfatase alcalina. Uma diminuição significativa da atividade enzimática foi observada para a cultura tratada com o íon metálico. Através da espectrofotometria de absorção atômica observou-se a remoção do metal do meio de cultivo ao longo do crescimento. Os resultados obtidos pela ultraestrutura demonstraram que *C. elegans* em presença de cobre, apresentou maior eletrondensidade, hifas mais largas e de textura mais homogênea, menor número de clamidósporos e poder de ramificação. Os estudos demonstram o potencial de *C. elegans*, visando sua aplicação em processos de biorremediação de ambientes poluídos por cobre.

Palavras Chave: *Cunninghamella elegans*; polifosfato; fosfatases; cobre.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the physiological, biochemical and ultrastructural aspects of *C. elegans* grown in copper presence. The growth profile was obtained by using biomass yields, glucose and phosphate consumption and pH. The polyphosphate profile, phosphatases activities and metal remotion were also studied. The results revealed the copper effects on the isolate growth according to the biomass yields. Glucose and phosphate consumption was similar to the control and treated cultures. The copper presence in the culture media induced variations on the polyphosphate profile. The polyphosphate level was almost constant in the beginning of control culture growth, and could be related to the exponential growth phase. On the other hand, the treated cultures exhibited a significant reduction in the polyphosphate levels, indicating an active metabolization of the polymer. The acid phosphatase activity was not detected in the isolate studied. However, the alkaline phosphatase activity was significantly lower in the treated cultures. By using the atomic absorption spectrophotometry the copper remotion of culture medium was observed during the microorganism growth. The ultrastructural analysis revealed differences in the *C. elegans* mycelia grown in copper presence. Variations related to the cell electrodensity, chlamidospores form and number, hyphal ramification process, hyphal texture and form were detected in the samples submitted to the metal treatment. The results revealed the potential use of *C. elegans* isolate in the remediation and biosorption studies in environments polluted by copper.

Key Words: *Cunninghamella elegans*; polyphosphate; phosphatases; copper.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos extremamente versáteis em suas respostas em função de variações ambientais. Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação, e microelementos influenciam o metabolismo e conseqüentemente, o crescimento celular, a diferenciação, formação de estruturas reprodutivas e diferenciação sexual (GARRAWAY & EVANS, 1984; GREENFIELD *et al.*, 1987; GRIFFIN, 1994; AOKI & NIRENBERG, 1999; KANA-UCHI & KUKATSUI, 1999; KIHARA *et al.*, 1999; KITAMOTO *et al.*, 1999; THAM *et al.*, 1999).

O crescimento de um organismo é um processo complexo e altamente coordenado, o qual envolve aspectos bioquímicos e fisiológicos do metabolismo, que acompanham o desenvolvimento e diferenciações celulares. Embora, proteínas, ácidos nucleicos, açúcares, lipídeos e fosfatos sejam constituintes biológicos básicos de todos os organismos vivos, sua composição, localização e estrutura podem variar gerando moléculas altamente diferenciadas em organismos distintos como resposta a condições ambientais (GARRAWAY & EVANS, 1984; GRIFFIN, 1994).

A indústria é responsável pela produção de diferentes substâncias poluentes encontradas na natureza. Dentre os principais poluentes, os metais pesados e seus derivados, exercem papel preponderante, os quais são diretamente prejudiciais à saúde humana e cujas substâncias orgânicas comprometem a manutenção dos processos vitais. Diversos ramos industriais são

responsáveis pela contaminação ambiental por metais pesados, entre estes: papel, petroquímica, cloro, fertilizantes, usinas siderúrgicas, metais não-ferrosos, automóveis, aviões, vidro, cimento, cerâmica, têxtil, curtumes e usinas termoelétricas. Na tentativa de reduzir os severos problemas causados por elevados níveis de concentração de metais no ambiente, vários estudos têm sido desenvolvidos para estabelecer parâmetros para a diminuição da concentração destes elementos em efluentes industriais (CONAMA, 1986; FELLEBERG, 1990; COATES & ANDERSON, 2000).

A contaminação por metais pesados é um fator desencadeante de processos tóxicos para peixes, crustáceos, plantas aquáticas, mamíferos e microrganismos. Estes metais podem ser facilmente transportados quando em solução, e muitas vezes, podem alcançar altas concentrações em áreas fechadas por sua própria disposição ou por amplificação biológica. Em geral, o tratamento de ambientes contaminados por metais envolve processos físico-químicos de precipitação, floculação, eletrólise, cristalização ou adsorção; entretanto, estes processos podem ser onerosos e/ou contribuir para formação de novos contaminantes ambientais, assim, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias mais econômicas e práticas para a remoção dos metais (UNZ & SHUTTLEWORTH, 1996; LOVLEY *et al*, 1997; RIAZ-UL-HAQ & SHAKOORI, 2000; PINTO *et al.*, 2002).

O cobre é um dos elementos mais importantes e essenciais para plantas e animais. No entanto, quando expostos a concentrações elevadas biodisponível, a bioacumulação pode ocorrer, com possíveis efeitos tóxicos (CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994; USPHS, 1997; DONMEZ & AKSU, 2001).

Os Zygomycetes, devido as suas características como fungos sapróbios, exibem crescimento em temperaturas que variam de 25<sup>o</sup>C a 42<sup>o</sup>C, de acordo com a espécie, como também versatilidade em relação às condições de aeração e produção de enzimas (ORLOWSK, 1991; GRIFFIN, 1994; WEITZMAN *et al.*, 1995).

As enzimas e polifosfato são moléculas de essencial importância em inúmeros eventos e fenômenos celulares. Dessa forma, estudos direcionados para a identificação, localização e mapeamentos dessas moléculas permitirão um maior entendimento sobre inúmeros eventos biológicos, não apenas ao nível ultraestrutural bem como, ao nível bioquímico e fisiológico (DE SOUZA, 2000).

As fosfatases ácida e alcalina compõem o grupo de enzimas chamadas fosfomonoesterases, não específicas, que hidrolisam uma variedade de ésteres orgânicos com a liberação de íons de fosfato, estando, desta forma, envolvidas no seu metabolismo. Estas duas fosfatases diferem tanto no pH ótimo de atividade, como na localização celular e suas atividades podem ser intensificadas pela ausência/presença de fosfato no meio de cultura (SCHURR & YAGIL, 1971; TIBBETT *et al.*, 1998).

Polifosfatos, por sua vez, atuam como fonte de energia, elementos de reserva de fósforo inorgânico, substituto de ATP, tampão para álcalis, quelante de metais e regulador de resposta ao estress. É adicionalmente utilizado na indústria como antibacteriano, antimicótico, aditivo, emulsificante e antioxidante, e no descarte ecológico de poluentes fosfatados (HAROLD, 1966; GREENFIELD *et al.*, 1987; KORNBERG, 1995).

Considerando a habilidade dos Zygomycetes, particularmente o gênero *Cunninghamella*, de metabolizar compostos xenobióticos e remover metais pesados, bem como, a relação do polifosfato com tolerância e resistência aos metais pesados, a presente proposta visa ampliar os conhecimentos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais do processo de remoção de metais pesados por *C. elegans*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1. FUNGOS: CLASSE ZYGOMYCETES

Os Zygomycetes e os Trichomycetes constituem as duas classes que integram o filo Zygomycota. Os Trichomycetes são parasitas obrigatórios de insetos e outros artrópodes. A classe Zygomycetes é integrada por fungos naturalmente saprófitos, e cosmopolitas, podendo ser cultivados a partir de amostras coletadas nas cavidades oral e nasal, nas fezes de animais saudáveis, solo, estrume, frutas, flores, grãos estocados, cogumelos, assim como de amostras de invertebrados e vertebrados, incluindo os seres humanos (LEVY *et al.* 1986; ALEXOPOULOS *et al.* 1996).

A reprodução dos Zygomycetes ocorre através de esporos de origem sexuada e assexuada. Os esporos de origem assexuada ou aplanósporos se originam em estruturas reprodutivas, esporângio ou por diferenciação da hifa em clamidósporo e artrósporo. Os esporos de origem sexuada ou zigósporos, formados a partir da união de hifas diferenciadas em gametângios femininos e masculinos, os quais se fundem ocorrendo então a cariogamia (DUBE, 1978).

O desenvolvimento pleno dos Zygomycetes ocorre na faixa de 25°C a 30°C, sendo a faixa de temperatura máxima de crescimento de 42°C a 58°C, de acordo com a espécie (WEITZMAN *et al.* 1995).

Os referidos fungos são capazes de se desenvolver nas mais diversas condições de aeração; no ar, na presença ou ausência de oxigênio, em condições microaerofíticas e em atmosfera de dióxido de carbono, apresentando o gênero

**Mucor** crescimento leveduriforme em atmosfera de 100% dióxido de carbono (LEHRER *et al.*, 1980).

Devido a sua participação nos processos de biodeterioração atacando materiais de diversas origens como couro, plásticos, madeira e alimento, podem ser úteis principalmente na reciclagem de lixo e formação de adubo e industrial, produção de enzimas, ácidos graxos, antibióticos, conservantes e ácidos lácticos (DUBE, 1978; TOMBS e BLAKE, 1982; ENDO *et al.*, 1985; OSMANI e SCRUTTON, 1985; TRUDEL e ASSELIN, 1990; BROWN *et al.*, 1993; CERTIK *et al.*, 1997).

Sendo assim, os Zygomycetes são organismos com grande potencial econômico-industrial, apresentando habilidade de adaptação a diferentes condições ambientais, como resposta a variações em suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representam elementos fundamentais na compreensão de seu comportamento celular, com vista a identificação de mecanismos específicos de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência (GRIFFIN, 1994; CARLILE & WATKINSON, 1996).

## 2.2. GÊNERO *Cunninghamella*

O gênero *Cunninghamella* é um dos mais comuns dentro da ordem Mucorales. As espécies do gênero são geralmente encontradas no solo e outros substratos orgânicos. Os representantes exibem colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com

diversos esporângios. O micélio quando jovem não exibe septo. A septação está associada à idade da cultura (BAIJAL & MEHROTRA, 1980; DOMSCH *et al.*, 1980).

Os esporos podem ser globosos ou ovais com paredes lisas ou com espículas, geralmente unicelulares. As espécies podem formar zigosporos globosos, escuros e tuberculados que são formados entre células suspensoras, geralmente heterotáticas. Clamidosporos podem ocasionalmente ser formados (DOMSCH *et al.*, 1980).

De um modo geral, os aspectos morfológicos são elementos fundamentais na identificação dos fungos. Do ponto de vista taxonômico, espécies de *Cunninghamella* podem ser identificadas por sua habilidade em responder a variações no meio de cultivo. Contudo, a separação das espécies é complexa e alguns estudos foram realizados para identificar caracteres de valor taxonômico como, por exemplo, a forma do esporângio analisada por microscopia óptica (O'DONNELL, 1979; SHIPTON & LUNN, 1980; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; CARLILE & WATKINSON, 1996).

O gênero *Cunninghamella* contém espécies de importância em micologia médica e em processos biotecnológicos. Na micologia médica, vários casos de infecções causados por *C. bertholletiae* já foram relatados inclusive casos de sinusites, zigomicose endobranquial e infecção pulmonar em pacientes com câncer e em pacientes com diabetes mellitus (DERMOURNI, 1993; NG *et al.*, 1994; KONTOYIANIS *et al.*, 1994). No campo biotecnológico a espécie de *C. bainieri* tem a capacidade para metabolizar xenobióticos, incluindo compostos aromáticos e drogas farmacológicas e ainda na bioabsorção de metais pesados. *C.*

*elegans* tem habilidade de oxidar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos de petróleo (FERRIS *et al.*, 1973; CERNIGLIA & GIBSON, 1977; JONES *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1996).

Inúmeros trabalhos de pesquisa que vêm noticiando a capacidade de várias espécies de *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, atuando na bioissorção de Cobre, Cádmio e Zinco, sob a forma de micélio vivo, e sob a forma de micélio morto, utilizando a biomassa como elemento de sorção. A atividade de filtro do micélio pode ser restaurada, removendo-se, com agentes químicos, o metal retido (LINCH, J. M., 1986).

### 2.3. POLIFOSFATO

O polifosfato inorgânico é um polímero linear formado por vários resíduos de fósforo inorgânico conectados por ligações fosfoanidrídicadas altamente energéticas, que formam estruturas não ramificadas quando hidrolisadas, gerando energia (HAROLD, 1966).

A ocorrência do polifosfato em um grande número de organismos, desde bactérias a células de mamíferos, sugere uma função biológica fundamental à vida, dependente da sua quantidade, localização celular, tamanho da cadeia e fonte biológica. Dentre as funções podem ser citadas: reserva de fosfato e energia, estoque e quelação de metais, formação de canais de membrana, participação no transporte de fosfato, envolvimento na função e formação do envelope celular, controle da atividade gênica, regulação da atividade enzimática e uma função vital em respostas celulares ao estress ambiental e na adaptação a fase estacionária de crescimento (WOOD & CLARCK, 1988; KUMBLE &

KORNBERG, 1995; KORNBERG *et al.*, 1999; KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000).

Ao longo da evolução dos seres vivos as funções do polifosfato foram, possivelmente, adequadas nos diferentes tipos celulares. Sendo assim, as funções mais importantes da molécula para os procariotos correspondem àquelas de reserva de fosfato e fonte de energia, enquanto que, nos eucariotos as funções reguladoras predominam. Conseqüentemente, há marcantes diferenças entre os dois grupos de organismos com relação ao conjunto de enzimas do metabolismo do polifosfato (KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000; KULAEV *et al.*, 2000).

Em 1976, Dietrich relatou a presença de polifosfato de baixo peso molecular em homogenados de extratos miceliais de Zygomycetes, utilizando eletroforese em gel de agarose.

Os distintos processos que resultam no acúmulo de polifosfato pelos microrganismos, e que podem ser induzidos por fatores ambientais, têm várias implicações biotecnológicas. Um desses processos envolve o acúmulo de polifosfato por inúmeros microrganismos submetidos a ciclos anaeróbicos/aeróbicos alternados. Este fenômeno é a base do processo de tratamento de efluentes contaminados com fosfato, designado de “remoção melhorada de fosfato biológico”. Além disso, organismos com habilidade de acumular polifosfato podem ser utilizados na biorremediação de efluentes contaminados com metais pesados. Vários estudos demonstraram a associação de grânulos de polifosfato com cátions e metais pesados. Em adição, a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência ou tolerância de alguns microrganismos a metais pesados reforça o seu potencial biotecnológico na

remoção destes elementos (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1997; MINO *et al.*, 1998; KEASLING *et al.*, 1999; KULAEV, 2000).

#### 2.4. FOSFATASES

O fósforo é um elemento essencial para alguns organismos, que podem absorver na forma de um anion ortofosfato ( $P_i$ ;  $H_2PO_4^-$  ou  $HPO_4^{2-}$ ). As fosfatases são enzimas chave na regulação do metabolismo em células. A deficiência de fósforo inorgânico causa uma significativa elevação intracelular e extracelular da atividade da fosfatase ácida em várias plantas (ELLIOTT *et al.*, 1986; GOLD-STEIN *et al.*, 1988; LEFEBVRE *et al.*, 1990) e fungos (TADANO & SAKAI, 1991; BRAIBANT & CONTENT, 2001).

As fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos fosfomonoésteres, as quais estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais, vegetais e em microrganismos. Estas enzimas são divididas em 3 grupos principais: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases (BRAIBANT & CONTENT, 2001).

As fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e utilizam como substratos compostos com baixa massa molecular (por exemplo, açúcares fosforilados). Contrastando com as fosfatases ácidas, as alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 9,0 e também atuam em substratos de baixa massa molecular relativa. No entanto, há necessidade de íons divalentes, como magnésio, cobalto ou manganês, para catálise (TIBBETT *et al.*, 1998).

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma grande família de enzimas (> 100) responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. São estruturalmente diversas, incluindo tipo citoplasmático e tipo receptor com a capacidade de transmitir sinais diretamente a enzimas de membrana e citoplasma, controlando diversos processos celulares (ZHANG *et al.*, 1996).

As fosfatases representam enzimas que permitem o acesso ao fósforo orgânico do meio ambiente. Dessa forma, as concentrações de fósforo disponível atuam como reguladores da expressão das enzimas nos fungos, o que caracteriza tais enzimas como induzíveis. Geralmente, ocorre uma forte relação inversa entre a concentração do fósforo do meio e fosfatase. Baixas concentrações de fósforo induzem maiores expressões (YAZAKI *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1996).

## 2.5. BIORREMEDIAÇÃO DE METAIS PESADOS

Devido ao desenvolvimento industrial, diversos produtos e subprodutos tornaram-se problemáticos pela sua ação recalcitrante, poluindo e afetando os mais variados ambientes das mais diversas formas, chegando a impossibilitar a sua utilização por completo. Dentre estes poluentes, os metais pesados são considerados dos mais perigosos, principalmente devido a sua capacidade cumulativa nas cadeias alimentares. Dessa maneira, elaborar estratégias para descontaminar ambientes poluídos com estes compostos têm recebido muita atenção de pesquisadores em todo o mundo (CONAMA, 1986).

A biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos conhecidos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos. Os sistemas biológicos geralmente utilizados são microrganismos e plantas. No entanto, a biodegradação com microrganismos é a opção mais frequentemente empregada. A biorremediação surgiu como uma tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. O benefício máximo desse processo é a mineralização, obtendo como produto final CO<sub>2</sub> e água pela via aeróbica, assim como a formação de biomassa. Desde meados dos anos 90, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas seriamente como uma maneira eficaz e de baixo custo para a remediação de solos contaminados por petróleo e outros compostos orgânicos, assim como metais pesados (PINTO *et al.*, 2002).

Estes poluentes xenobióticos podem ser removidos do ambiente por uma variedade de vias biológicas, químicas e físicas. Atualmente, as técnicas de biorremediação, oferecem novas possibilidades para acelerar a degradação destes poluentes, quer adicionando-se os nutrientes necessários à população microbiana natural, quer adicionando-se culturas mistas ou puras, que apresentem as vias metabólicas que permitam a rápida metabolização do contaminante (VOLESKY & HOLAN, 1995; VIEIRA & VOLESKY, 2000; BRARKER & BRYSON, 2002).

Muitos estudos têm demonstrado a existência de uma grande diversidade de microrganismos biodegradadores presentes em amostras de solo, sedimento, água doce ou ambiente marinho que ocorrem naturalmente nestes ambientes. Em geral, os microrganismos capazes de degradar um xenobiótico específico são encontrados com maior frequência nos locais contaminados previamente com o poluente. As vias de degradação destes compostos por microrganismos específicos e a organização genética dos genes envolvidos na degradação dos mesmos têm sido intensivamente estudadas (XIANG, *et al.*, 2000; BARKAY & SCHAEFER, 2001; ZOUBOULIS & KATSOYIANNIS, 2003).

São considerados metais pesados aqueles que apresentam densidades atômicas maiores que  $6\text{g/cm}^3$ , encontrando-se entre eles o cádmio, cromo, cobre, mercúrio, níbio, chumbo e o zinco. No entanto, quando as concentrações começam a se apresentar acima de valores convencionais, os seres vivos podem passar a apresentar sinais de estresse acarretados pela interferência desses metais, nos diferentes passos nas vias metabólicas, de forma que os íons metálicos acarretam mudanças na permeabilidade da parede celular, inibição da síntese protéica, interferência nos processos respiratórios, fotossíntese e inibir a ação de enzimas (NIES, 1999).

O cobre é um nutriente essencial que é incorporado em uma série de sistemas de enzimas de animais, plantas, microrganismos e seres humanos (CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994; UPHS 1997).

Os microrganismos, em geral, podem acumular ou transformar elementos metálicos, como resultado de reações enzimáticas específicas ou de mecanismos decorrentes das características e propriedades da parede celular e da membrana

plasmática. Obviamente, esses processos de bioacumulação ou biotransformação de metais vêm ocorrendo naturalmente no ambiente desde o aparecimento desses seres no planeta. Todavia nem sempre os microrganismos acumulam metais devido a necessidade metabólica. O processo de acumulação de metais em microrganismos pode ser dividido em dois passos, o primeiro envolve adsorção de metais na célula e é um mecanismo-independente, e o segundo é exclusivamente dependente do metabolismo celular e envolve translocação ativa de metais dentro da célula - bioacumulação (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; GOMES *et al.*, 1998).

A ligação de metais à superfície celular dos microrganismos, processo chamado de bioadsorção, é o fenômeno de adsorção que ocorre através de interações eletrostáticas entre cátion metálico e a superfície carregada negativamente da célula microbiana. Desta forma, a capacidade de “adsorver” metais vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie (GOMES *et al.* 1998).

A bioacumulação intracelular de metais pode ser entendida como uma segunda fase do processo de absorção dos metais por microrganismos vivos, decorrendo, dessa forma, de um mecanismo celular ativo, que ocorre numa primeira fase, com gasto de energia (ATP). Assim esse processo difere na sua essência da adsorção físico-química passiva. A bioacumulação requer geralmente sistemas específicos de transporte e dependerá do grau de tolerância da célula ao metal (DONMEZ & AKSU, 2001).

As características microbianas de adsorver, acumular ou precipitar extracelularmente os metais, conferem aos microrganismos o potencial para o

desenvolvimento de processos de tratamento biológico de efluentes industriais, esgotos domésticos e águas poluídas em geral, nas quais se detecta a presença de metais em suas formas tóxicas (HOLAN & VOLESKY, 1994).

Os fungos são capazes não só de sobreviver em ambientes poluídos com metais, como também de removê-los, acumulando-os em suas hifas. São organismos ubíquos e oferecem um “pool” genético para a ligação de enzimas associadas à contaminação de metais (LLOYD & LOVLEY, 2001).

Considerando as habilidades dos fungos de crescer em ambientes diversos. Tornou-se fundamental estudo associado ao desenvolvimento de estratégias que explorem tais habilidades.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Avaliar o comportamento bioquímico, fisiológico e ultraestrutural da linhagem UCP 542 de *Cunninghamella elegans* durante o crescimento em presença de cobre.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de crescimento de *C. elegans* na presença e ausência de cobre;
- Verificar o comportamento do polifosfato durante o crescimento de *C. elegans* na presença e ausência de cobre;
- Determinar a atividade das fosfatases ácida e alcalina na presença e ausência de cobre em *C. elegans*;
- Avaliar o processo de remoção de cobre do meio de cultura por *C. elegans*;
- Avaliar a ultraestrutura de *C. elegans* cultivado em presença e ausência do metal pesado cobre através de microscopia eletrônica de varredura.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MICRORGANISMO

O fungo *C. elegans* (UCP 542), isolado de sedimento de mangue do Município do Rio Formoso (GOMES *et al.*, 2000), foi obtido do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco e mantido em meio de cultura batata dextrose ágar a 5<sup>o</sup> C.

### 4.2. MEIOS DE CULTURA

#### 4.2.1. MEIO DE MANUTENÇÃO

O Meio Batata Dextrose Ágar (BDA), foi utilizado para manutenção da amostra durante o experimento.

Batata.....	200,0g
Dextrose.....	20,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

pH - 5,6

O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e distribuído em tubos.

#### 4.2.2. MEIO PARA ESPORULAÇÃO

O meio Sabouraud Dextrose e Agar (SDA) foi utilizado para a obtenção de esporos da cultura de *C. elegans*.

Glicose.....	20,0g
Peptona.....	10,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

pH - 5,6

O meio foi autoclavado durante 15 minutos a temperatura de 121°C.

#### 4.2.3. MEIO DE CRESCIMENTO

O meio Synthetic Medium for Mucoralean, SMM descrito por Hesseltine & Anderson (1957) e modificado pela variação da concentração de fosfato de potássio (de 0,5g/L para 0,1g/L) foi utilizado para o crescimento da amostra durante o experimento.

Glicose.....	40g
Asparagina.....	2g
Fosfato de potássio.....	0,1g
Sulfato de magnésio.....	0,25g
Tiamina.....	0.5mg
Água destilada.....	1000mL

pH = 6,0

O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C.

### 4.3. SOLUÇÃO METÁLICA

A solução de sulfato de cobre utilizada neste trabalho foi preparada com água destilada deionizada na concentração de 2 mM (p/v), pH 6,0, ajustado utilizando-se soluções de hidróxido de sódio 1N e ácido acético 10% (v/v).

### 4.4. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

#### 4.4.1. PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Amostra de *C. elegans* (UCP 542) foi inoculada em placas de Petri contendo o meio BDA (item 4.2.1) como forma de manutenção da cultura.

A partir do inóculo em BDA, a amostra foi repicada em placas de Petri contendo 15 mL do meio de esporulação SDA (item 4.2.2) a temperatura de 28°C durante 7 dias. Após esse período, os esporos foram coletados, com o uso de cotonetes, previamente esterilizados e umedecidos em água destilada estéril, sendo determinado o número de esporos em câmara de Neubauer.

Alíquotas de 1 mL de suspensão de esporos contendo  $10^7$  esporos/mL foram utilizadas como inóculo.

#### 4.4.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Alíquotas de 1 ml de suspensão de esporos contendo  $10^7$  esporos/mL foram inoculadas em frascos de Erlenmeyers com capacidade para 150 mL, contendo 50 mL do meio SMM (item 4.2.3) com e sem a solução de sulfato de

cobre (item 4.3). Em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação orbital de 150 rpm, a temperatura de 28°C por um período 120 horas.

Alíquotas foram coletadas nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas, para determinação da curva de crescimento, atividade enzimática, avaliação do conteúdo do polifosfato, estudo ultraestrutural, pH, consumo de glicose, fosfato e dosagem do cobre.

#### 4.4.3. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

O micélio coletado durante os intervalos de cultivo foi lavado por duas vezes com água destilada deionizada gelada, e submetido ao processo de liofilização, sendo, posteriormente mantido em dessecador a vácuo até peso constante.

A média do peso seco em triplicata, foi utilizada para estabelecer o gráfico correspondente à curva de crescimento.

### 4.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

#### 4.5.1. DETERMINAÇÃO DO pH

As variações de pH dos meios de cultura foram acompanhadas ao longo do crescimento. O valor do pH em cada ponto do intervalo correspondeu à média de três aferições. Posteriormente, uma curva de pH foi estabelecida com esses valores.

#### 4.5.2. DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO INORGÂNICO E GLICOSE

Para determinar o consumo de glicose e de fósforo inorgânico do meio, alíquotas de 5mL do sobrenadante de cultura foram coletadas nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo.

O consumo de fosfato do meio de cultura foi determinado pelo método colorimétrico Fiske-Subbarow, 1925 que se baseia na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, resultando em um complexo fosfomolibdato de cor azul, quantificado espectrofotometricamente a 600 nm, e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do fósforo. Uma curva padrão foi elaborada, utilizando-se uma solução de fósforo (0,5 – 5,0 mg/dL). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, Spectronic, modelo Genesys 2. A determinação de glicose foi realizada pelo método enzimático colorimétrico (Lab-test), que se fundamenta na oxidação enzimática da glicose presente nas amostras dos sobrenadantes de cultura coletados nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo, pela enzima glicose-oxidase. Após a reação é formado um complexo cromogênico vermelho cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose, que pode ser determinada pela leitura da absorvância a 510 nm (HENRY *et al.*, 1974). Uma curva padrão foi elaborada, utilizando-se uma solução de glicose (0,5 – 5,0 g/L). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, Spectronic, modelo Genesys 2.

#### 4.5.3 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE POLIFOSFATO TOTAL

O polifosfato intracelular total foi extraído e dosado segundo o método descrito por Mcgrath & Quinn (2000). Amostras de 7mg de micélio (peso seco), obtidas no meio de incubação, durante os intervalos de cultivo do fungo, nas

amostras controle e tratadas foram coletadas e lavadas duas vezes em solução de NaCl 1,5M contendo EDTA 0,01M e NaF 1mM. Em seguida, foram colocadas na solução de lavagem e sonicadas, em gelo, por 12 períodos de 2 minutos com intervalos de 1 minutos em 16 KHz. O extrato resultante foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4°C para remover os fragmentos celulares. Para determinar o conteúdo do polifosfato celular total, 100µl de HCl concentrado foi adicionado a 0,5 ml do extrato celular e aquecido a 100° C por 45 minutos. O fosfato liberado foi dosado utilizando-se o método descrito no item 4.5.2. A concentração do polifosfato celular total nas amostras foi expressa em miligramas de fósforo por decilitro e dadas como média de triplicatas. Uma amostra não hidrolisada foi utilizada como um controle para determinar o nível de fosfato livre da célula.

#### 4.5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA

Amostras de 36 mg de micélio (peso úmido), oriundas do meio com e sem cobre e coletadas nos intervalos de cultivo do fungo, foram lavadas com água deionizada e incubadas em 3ml de solução extratora composta de tampão acetato de sódio 0,02M, pH 4,5, para fosfatase ácida e para a fosfatase alcalina tampão Tris – HCL 50 mM, pH7,5, contendo 5% de glicerol. As amostras foram maceradas através de almofariz e pistilo por 5 minutos e em seguida homogeneizadas por 2 minutos, em gelo.

O extrato resultante foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4°C para remover os fragmentos celulares. Para a determinação da atividade enzimática, nos extratos celulares utilizou-se o Kit Lab-Test. Os resultados correspondem a média de triplicatas. A unidade de atividade enzimática utilizada foi a Unidade Internacional (U.I.), que corresponde a quantidade de enzimas que catalisa o desdobramento de 1 $\mu$ mol de substrato/minuto/litro da amostra.

#### 4.6. BIOSSORÇÃO DE COBRE

Amostras de biomassa e sobrenadante retiradas nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas, após filtração em Nylon (120F – ref. 505991) foram utilizadas no experimento de sorção do metal. O experimento foi realizado em triplicata, onde o resultado final foi a média obtida das amostras. Em seguida foi elaborada uma curva de remoção do metal durante o crescimento do fungo.

##### 4.6.1. DETERMINAÇÃO DA REMOÇÃO DO COBRE NO LÍQUIDO METABÓLICO

Para determinar a remoção do cobre, 3ml de sobrenadante de cultura coletadas nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas, foram submetidos a espectrofotometria de absorção atômica, espectrofotômetro modelo (GBC 932 AA).

#### 4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras coletadas nos intervalos de 36, 72 e 120 horas de cultivo foram lavadas em PBS, pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a etapa de fixação, todas as amostras foram

novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Seguindo-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora a temperatura ambiente, em condições de escuridão. Em seguida, as amostras foram mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente submetidas ao processo de desidratação. Para a desidratação das amostras foi utilizado álcool etílico, em proporções de 50%, 70%, 90% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico para eliminação total da fase líquida, seguindo-se a montagem em suportes de alumínio e posterior metalização. Assim preparadas, as amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL LSM 5.600 LV), operando a 20 Kv.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO

Os estudos iniciais foram dirigidos para a produção de biomassa por *C. elegans* (UCP 542) tendo sido estabelecida a curva de crescimento do microrganismo. Os resultados apresentados na Figura 1 mostram o perfil de crescimento de *C. elegans*, no meio de cultura SMM, utilizando os intervalos 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo, acompanhado através da determinação do peso seco.

Uma análise da curva de pH permite observar que a partir da inoculação dos esporos no meio SMM, pH 6,0 no decorrer do período de 120 horas de cultivo demonstrou discreta oscilação apresentando valores aproximadamente constantes na faixa de 3,82 e 4,25 (Figura 1 A).

Em relação à glicose verificou-se o consumo de 89,36% nas primeiras 12 horas de cultivo, com progressivo declínio, atingindo 91,09% ao término do cultivo (120 horas), com o maior rendimento de biomassa, onde se observou peso seco correspondente a 122,9 mg/L (Figura 1B).

Considerando-se o comportamento de crescimento relacionado ao consumo de fósforo, verificou-se um consumo de 86,02% durante as 12 horas iniciais de cultivo. A exaustão total (100%) do nutriente adicionado ao meio foi detectada a partir de 36 horas de crescimento (Figura 1C).

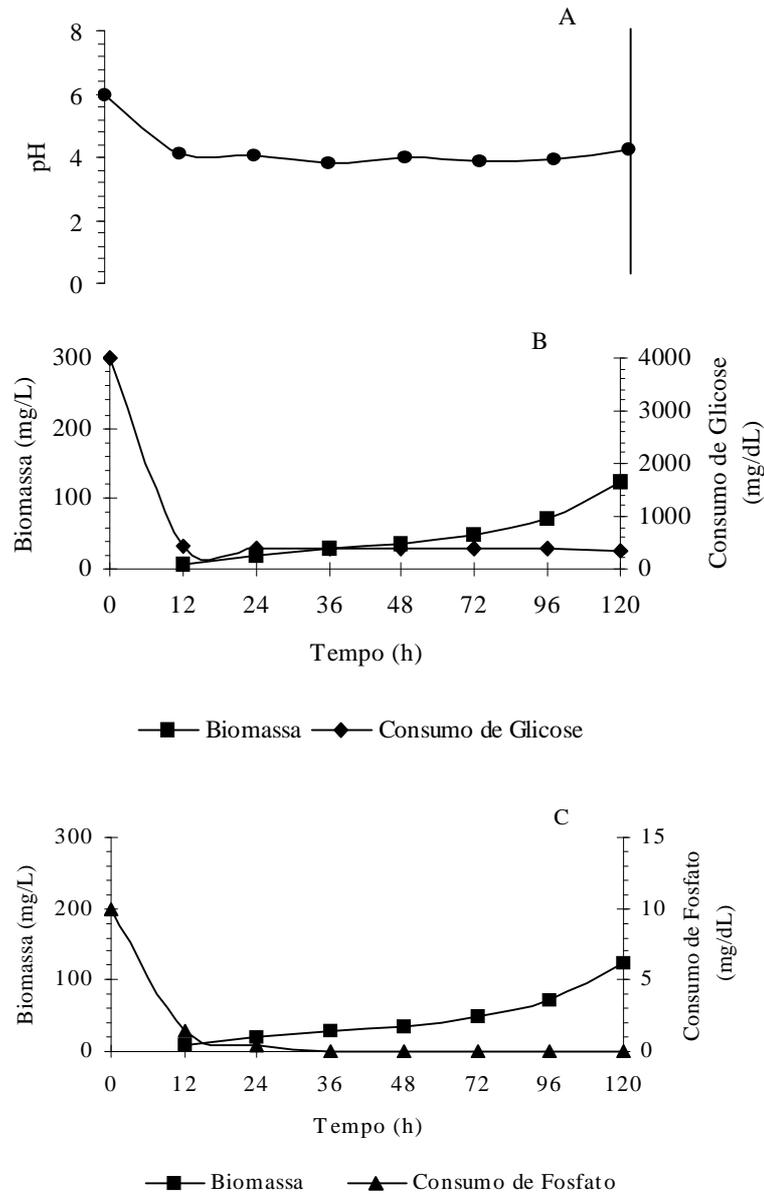


Figura 1. Perfil de crescimento da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans* cultivado em meio Synthetic Medium for Mucorales - SMM, 150 rpm, durante 120 horas: pH do meio (A), consumo de glicose (B), consumo de fosfato (C).

A Figura 2 mostra o perfil de crescimento de *C. elegans*, no meio de cultura SMM em presença do metal pesado cobre. Pode-se observar que a partir da inoculação dos esporangiosporos o pH decresce de forma contínua, até o final do cultivo, atingindo o valor de 4,61 (Figura 2 A). Na Figura 2B verifica-se que ocorreu crescimento logarítmico da cultura durante todo o período experimental (120 horas de cultivo) e que o rendimento da biomassa atingiu 288,2 mg/L durante as 120 horas de cultivo, não se observando a fase de crescimento estacionário para a cultura de *C. elegans* nas condições estudadas.

Quanto ao comportamento da glicose pode-se verificar a ocorrência de um consumo de 87,24% durante as 12 horas iniciais de crescimento. Contudo, ao final do período experimental, 92,7% da glicose foi consumida pela cultura, promovendo um maior rendimento de biomassa.

Considerando o consumo de fosfato do meio de cultivo com o metal verificou-se que durante as primeiras 12 horas de cultivo um total de 80,96% da fonte foi consumida. A partir de 24 horas ocorreu declínio progressivo, e a cultura atinge 100% de consumo do fosfato adicionado ao meio (Figura 2C).

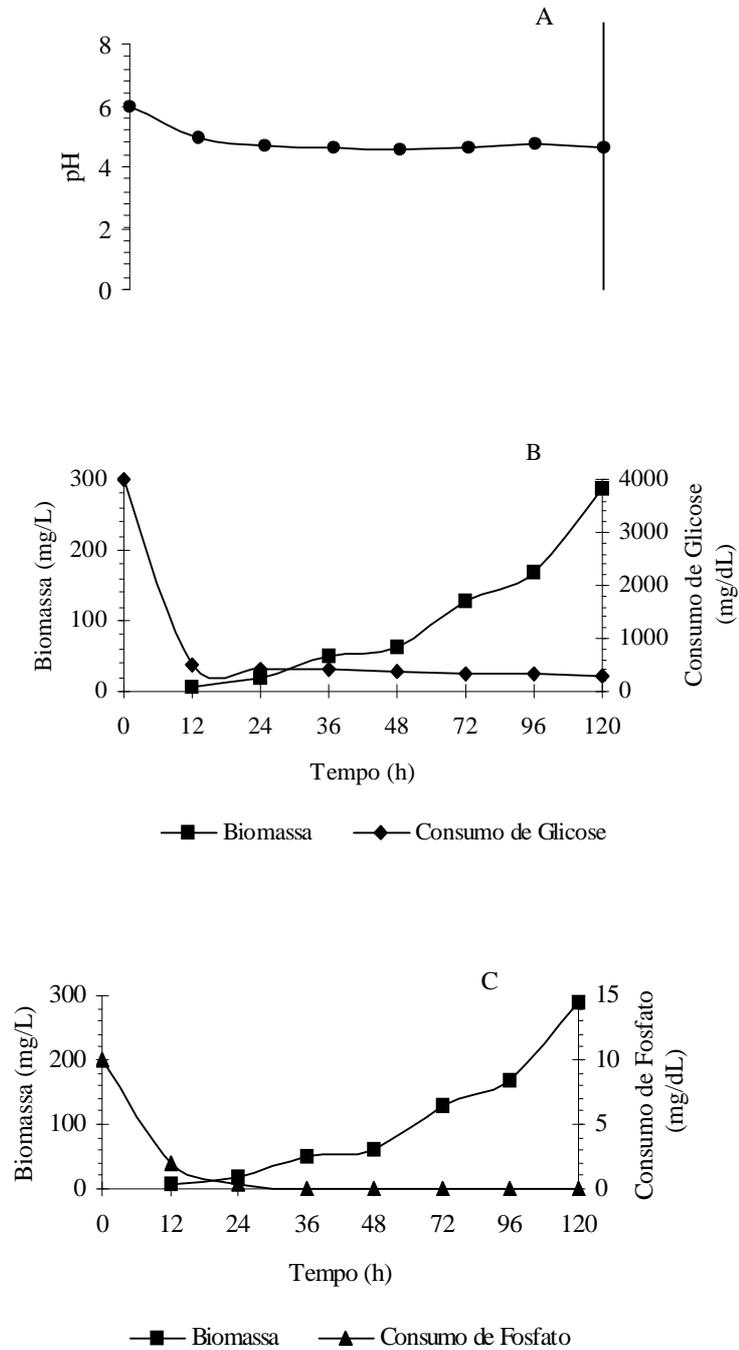


Figura 2. Perfil de crescimento da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans* cultivado em meio Synthetic Medium for Mucorales - SMM, em presença do cobre, 150 rpm, durante 120 horas: pH do meio (A), consumo de glicose (B), consumo de fosfato (C).

O comportamento fisiológico da linhagem UCP-542 de *C. elegans*, cultivada na ausência do metal, em relação ao conteúdo de polifosfato foi relacionado à produção de biomassa da cultura ao longo do crescimento (Figura 3).

Verificou-se que durante as primeiras 36 horas de cultivo o micélio apresenta conteúdos correspondentes a 2,3 mg/dL, 2,2 mg/dL e 2,15mg/dL, nos intervalos de 12 horas, 24 horas e 36 horas de cultivo, respectivamente. A partir de 36 horas de cultivo ocorre uma diminuição no conteúdo do polifosfato micelial e um concomitante aumento no rendimento de biomassa na cultura.

Na Figura 4 pode-se observar o comportamento fisiológico da linhagem UCP-542 de *C. elegans* em relação à produção de biomassa e conteúdo de polifosfato em micélio no meio SMM na presença do metal cobre, durante o crescimento. Evidenciam-se valores de 2,3 mg/dL, 1,24 mg/dL e 0,99 mg/dL, para os intervalos de 12, 24 e 36 horas, respectivamente. Dessa forma, houve uma diminuição significativa em relação ao conteúdo de polifosfato nas amostras controle. Contudo, ocorreu um aumento no conteúdo do polifosfato micelial no intervalo de 48 horas de crescimento (1,24 mg/dL), caracterizando sua síntese e acúmulo nesse período. A partir de 48 horas houve novo declínio no conteúdo de polifosfato do micélio até o final do período experimental, atingindo valores de 0,43 mg/dL, 0,28 mg/dL até a exaustão total do polifosfato, nos períodos de 72 horas, 96 horas e 120 horas de cultivo, respectivamente.

Relacionando-se o rendimento da biomassa ao conteúdo de polifosfato na cultura da linhagem UCP-542 de *C. elegans* submetida ao tratamento com cobre verificou-se uma variação em relação à cultura controle. Observou-se maior produção de biomassa e menores valores para o conteúdo total de polifosfato no micélio cultivado em presença do metal.

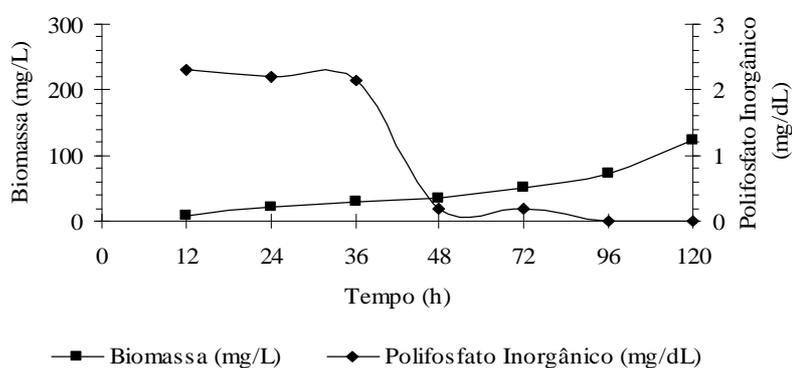


Figura 3. Curva de polifosfato relacionada ao crescimento da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans* cultivado no meio Synthetic Medium for Mucorales, 150 rpm, durante 120 horas de cultivo.

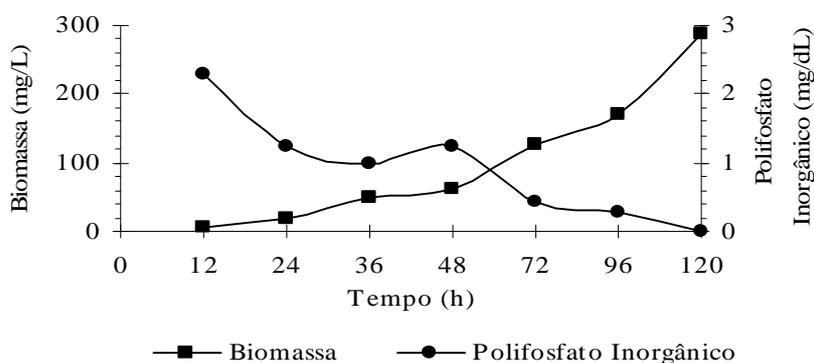


Figura 4. Curva de polifosfato relacionada ao crescimento da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans* cultivado no meio Synthetic Medium for Mucorales, adicionado de cobre (2mM), 150 rpm, durante 120 horas de cultivo.

## 5.2. ATIVIDADE FOSFATASE ÁCIDA E ALCALINA

A determinação das atividades das enzimas fosfatase ácida e alcalina foi analisada em culturas da linhagem UCP-542 de *C. elegans* cultivadas em presença e ausência de cobre. Com a utilização do método descrito por JOH *et al* (1996) para as condições experimentais aplicadas neste estudo não foi possível detectar a presença da enzima fosfatase ácida, nas amostras testadas. Por outro lado, os resultados obtidos em relação à atividade da enzima fosfatase alcalina para as amostras controle e tratadas estão apresentados na Figura 5.

Verificou-se, para a amostra controle, uma contínua diminuição da atividade da enzima ao longo do período experimental. A atividade máxima foi observada no período de 12 horas de cultivo, correspondendo a 5,08 U.I. e ao final do período experimental, observou-se uma atividade correspondente a 2,22 U.I. foi obtido. Por outro lado, a atividade enzimática nas amostras de *C. elegans* submetidas ao crescimento em presença de cobre apresentou-se muito diferente daquela da cultura controle. Uma atividade de 1,26 U.I. e 1,28 U.I. foi determinada para as amostras com 12 horas e 24 horas de cultivo. A partir de 36 horas os valores decresceram progressivamente atingindo valor mínimo de 0,39 U.I. no período de 96 horas e um aumento na atividade enzimática para 0,81 U.I. foi detectado com 120 horas de cultivo.

Comparando-se os valores obtidos para as amostras controle e tratadas observou-se uma variação significativa da atividade da fosfatase alcalina no micélio de *C. elegans*.

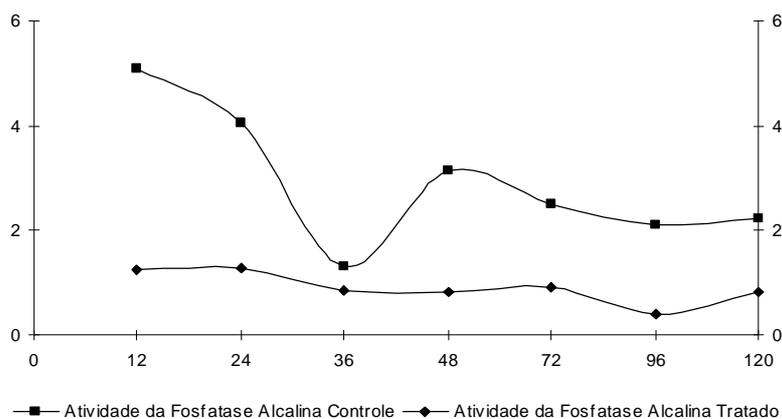


Figura 5. Curvas de atividade da fosfatase alcalina no micélio da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans* cultivado na presença e ausência de cobre.

Uma análise comparativa entre o conteúdo de polifosfato no micélio e atividade enzimática para as culturas controle e tratada estão apresentados na Figura 6. Verificou-se que ocorreu diminuição progressiva do polifosfato e da atividade enzimática ao longo do período experimental. Para a cultura controle, ao longo do período experimental, uma diminuição de atividade de 56,29% foi observada. A cultura tratada exibiu uma diferença percentual menor que 75,2% na atividade da fosfatase alcalina durante as primeiras 12 horas de cultivo, em relação ao controle, sendo que a cultura tratada exibiu uma diminuição de 35,71% na atividade enzimática ao longo do período experimental.

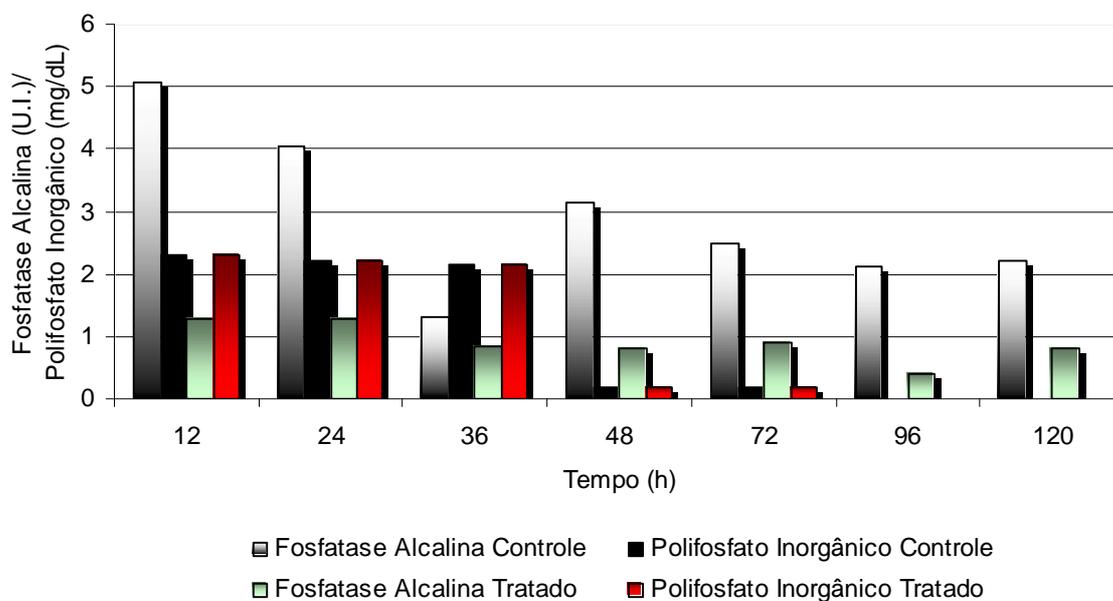


Figura 6. Histograma comparativo da atividade da fosfatase alcalina no micélio da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans*, cultivado em presença e ausência de cobre e o conteúdo de polifosfato ao longo do crescimento.

### 5.3. BIOSSORÇÃO DE COBRE

Amostras dos líquidos metabólicos coletados nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo foram submetidas à espectrofotometria de absorção atômica para determinação do conteúdo de cobre ao longo do crescimento da linhagem UCP-542 de *C. elegans*.

A capacidade de remoção do cobre do meio de cultura está apresentada na Figura 7. Observou-se que ao longo do período experimental, o conteúdo de cobre adicionado ao meio de cultura diminuiu progressivamente, durante as primeiras 12 horas de cultivo, 32,38% do conteúdo total de cobre adicionado ao meio foi removido pela cultura. Ao final do período experimental um percentual de 72,79% de cobre foi removido do meio de cultura.

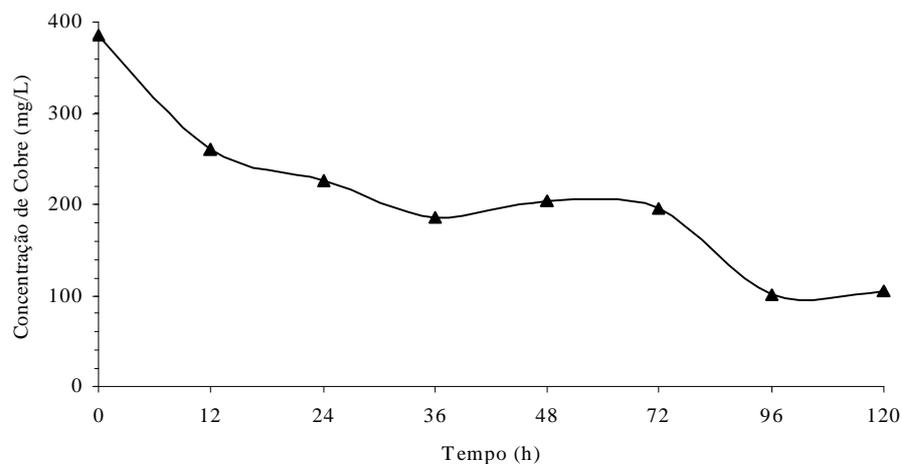


Figura 7. Concentração de cobre no líquido metabólico ao longo do crescimento da linhagem UCP-542 de *Cunninghamella elegans* no meio Synthetic Medium for Mucorales, adicionado de cobre (2mM), 150 rpm, durante 120 horas de cultivo.

#### 5.4. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS

A estrutura fina da linhagem UCP-542 de *C. elegans*, cultivada em meio SMM, controle e tratado, está apresentado nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente. A ultraestrutura de hifas de *C. elegans*, coletada no intervalo de 36 horas, obtidas da cultura controle e tratado, estão apresentados nas Figuras 8A e 8B, respectivamente.

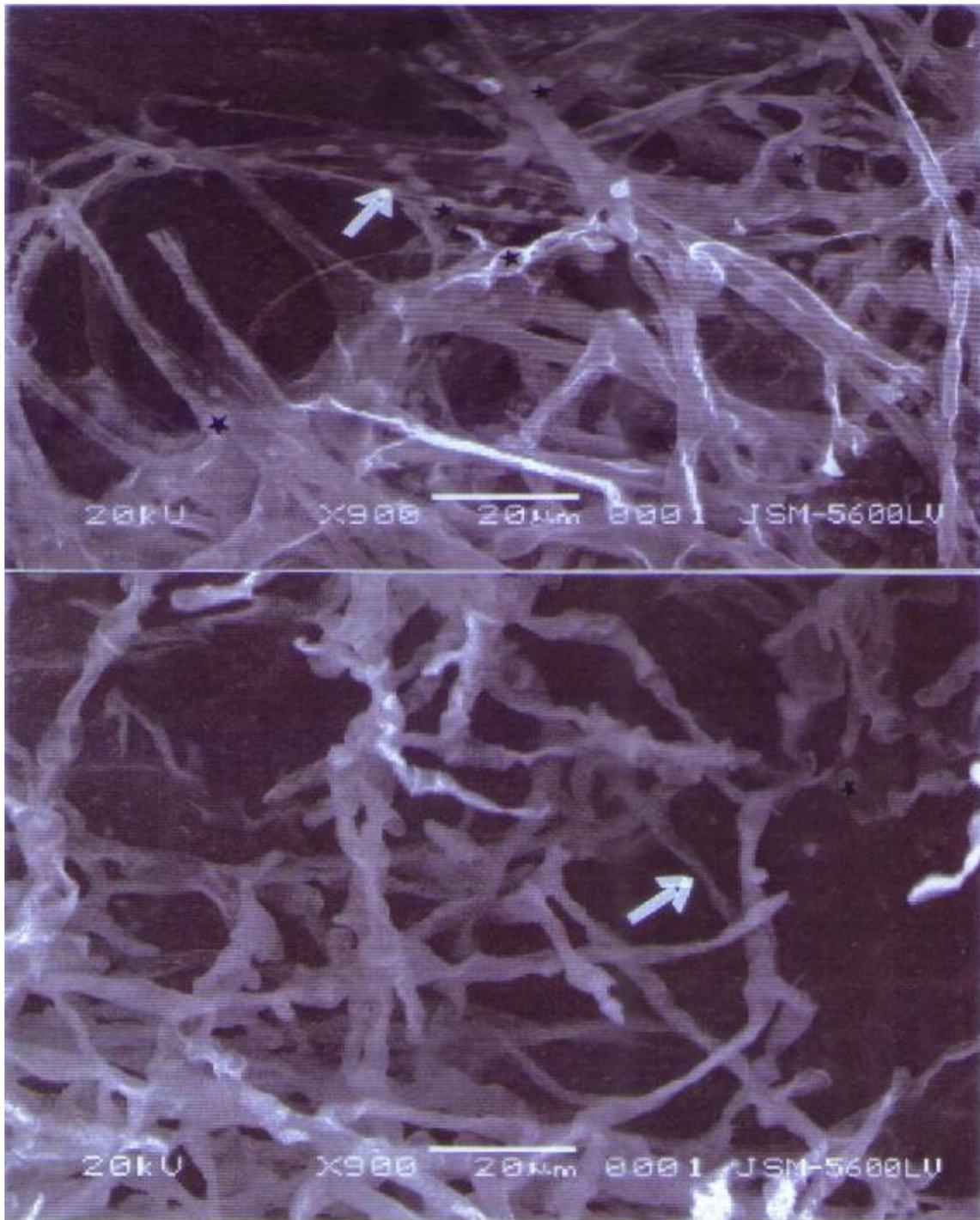
A análise das micrografias obtidas através do método rotina para a microscopia eletrônica de varredura permitiu verificar a ocorrência de hifas com textura lisa e homogênea, profusamente ramificadas, largas e transparentes, apresentando grande quantidade de clamidosporos com diferentes formas e tamanhos (Figura 8A). Por outro lado, Na Figura 8B hifas cultivadas em presença

de cobre apresentam-se mais eletrondensas, forma tubular com textura lisa e homogênea. Clamidosporos com forma globosa e em número reduzido foram observados na cultura adicionada de cobre quando comparado à amostra controle.

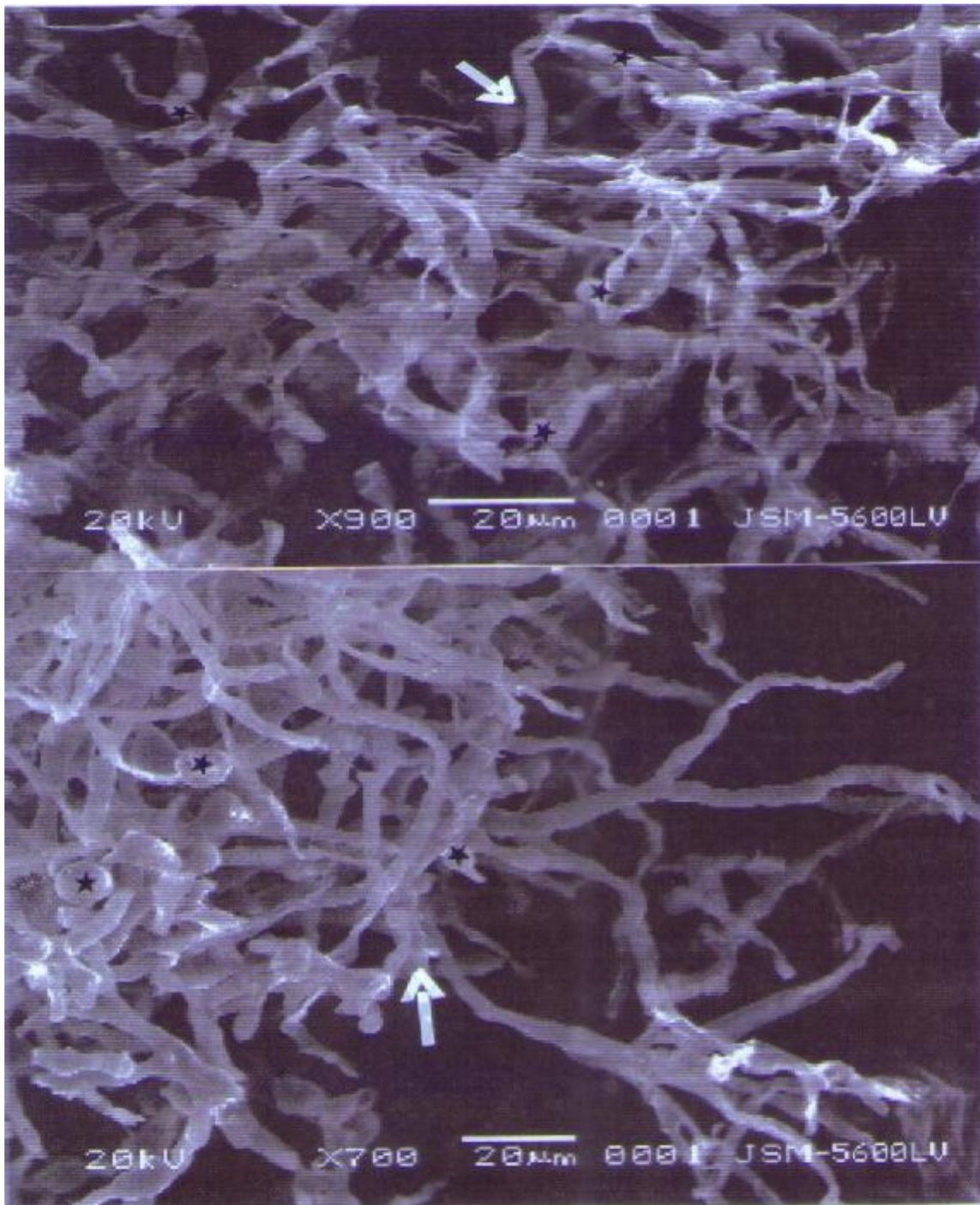
Amostras com 72 horas de cultivo, controle e tratadas, estão apresentadas nas Figuras 9A e 9B, respectivamente.

A Figura 9A permitiu observar a existência de hifas transparentes e com eletrondensidade maior que a amostra com 36 horas. A Figura 9B apresenta hifas mais desenvolvidas, maior número de clamidosporos.

As amostras coletadas no intervalo de 120 horas de cultivo, das culturas controle e tratadas, estão apresentadas nas Figura 10A e 10B. As hifas de *C elegans* na Figura 10A exibem: ramificação mais profusa, alta transparência e maior número de clamidosporos. Ocorrência semelhante é observado na Figura 10B, onde pode-se observar hifas mais intensamente ramificadas, cujas extremidades têm forma de pêra.



**Figura 8.** *Cunninghamella elegans* (UCP-542) cultivada em SMM (8A) e SMM com cobre (8B): Eletronmicrografias de varredura. A- Amostra Controle; B- Amostra cultivada em presença de cobre. Amostras com 36 horas de cultivo. clamidosporos (★); hifas (□).



**Figura 9.** *Cunninghamella elegans* (UCP-542) cultivada em SMM (9A) e SMM com cobre (9B): Eletronmicrografias de varredura. A- Amostra Controle; B- Amostra cultivada em presença de cobre. Amostras com 72 horas de cultivo. clamidiosporos (□); hifas (□).



**Figura 10.** *Cunninghamella elegans* (UCP-542) cultivada em SMM (10A) e SMM com cobre (10B): Eletromicrografias de varredura. A- Amostra Controle; B- Amostra cultivada em presença de cobre. Amostras com 120 horas de cultivo. clamidosporos (□); hifas (□).

## 6. DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento dos processos industriais, surgiram novos compostos químicos sintéticos que por sua vez foram lançados no meio ambiente indiscriminadamente. Muitos destes compostos, chamados xenobióticos, ocorrem na natureza (Ex: hidrocarbonetos do petróleo) ou são suficientemente similares a estes, estando sujeitos ao metabolismo microbiano. Estes compostos que resistem à biodegradação ou não são metabolizados completamente, acumulando-se no ambiente, podem ser considerados recalcitrantes ou persistentes. Desta forma os poluentes contaminam o ambiente e podem interferir no funcionamento normal da biosfera (CERNIGLIA & GIBSON, 1977; PARALES *et al.*, 2002).

A diversidade genética e metabólica dos fungos têm sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, tais como antibióticos (penicilina, etc.), alimentos (cogumelos, etc.), processantes de alimentos (queijo, iogurte, vinagre, etc.), bebidas alcólicas (vinho, cerveja, etc.), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), álcoois (etanol), fermentados (molho de soja), agentes de tratamento e/ou remediação de resíduos (esgotos domésticos, lixo), e, na agricultura, na fertilização de solos (fixação biológica de nitrogênio) e controle biológico de pragas e doenças (VILLEN, 2003).

Os fungos, conforme mencionado, são organismos muito versáteis no que diz respeito às condições ambientais. Podem alterar suas atividades metabólicas em resposta a variações das condições físicas e químicas de um ambiente. O padrão de atividade das diferentes biomoléculas informa sobre as suas

características celulares, as quais, sem dúvida, expressam as habilidades potenciais de um organismo, em um dado momento metabólico, e sob determinadas pressões ambientais (LLOYD, 2002; FU & VIRARAGHAVAN, 2002).

Como mencionado, dentre os fungos, os Zygomycetes são organismos com grande potencial econômico-industrial e na medicina. Além disso, sua habilidade de adaptação à diferentes condições ambientais, resultado de variações em suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representa um elemento fundamental na compreensão de seu comportamento celular, com vista à identificação de mecanismos específicos de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência (ZHANG *et al.*, 1996; LAMACKA & SAJBIDOR, 1998; POTHULURI *et al.*, 1998a , 1998b).

Os fungos têm sido utilizados para o tratamento de resíduos e rejeitos industriais e urbanos. O potencial de uso reside em seu arsenal enzimático, produzido em resposta ao ambiente e secretado como metabólito secundário (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995).

O gênero *Cunninghamella* apresenta alta relevância por exibir a habilidade de metabolizar compostos xenobióticos em resposta a excreção de hidrolases (BAIJAL & MEHROTRA, 1980; REDDY *et al.*, 1990; FOSTER *et al.*, 1991; POTHULURI *et al.*, 1992; SCHWARTZ *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1996; LAMACKA & SAJBIDOR, 1998; POTHULURI *et al.*, 1998a , 1998b).

O presente trabalho baseou-se na utilização de um isolado (UCP-542) de *C. elegans* para análise do comportamento deste fungo frente ao cobre, caracterizando-se para tal, aspectos bioquímicos e estruturais relativos ao consumo de fontes de carbono, fósforo, sistema de atividade de fosfatases,

comportamento do polifosfato e potencial de sorção do metal pelo microrganismo. Os resultados apresentados para o crescimento do isolado (UCP-542) de *C. elegans*, determinado pela biomassa, consumo de ortofosfato do meio, comportamento do pH e consumo de glicose, apontaram para diferenças em relação à presença do metal cobre no meio de cultivo. O maior rendimento na biomassa foi obtido na presença do metal, atingindo 288,2 mg/L em relação a uma produção máxima de 122,9 mg/L da cultura controle, o que representa uma queda de rendimento de 57, 3% em relação ao meio SMM com cobre.

Relatos na literatura apontam a influência do cobre sobre o crescimento de microrganismos, bem como seu importante papel como elemento traço em sofisticadas reações bioquímicas. A função mais importante do cobre reside em seu efeito sobre a citocromo c oxidase e enzimas relacionadas, essenciais ao processo respiratório. Contudo, em altas concentrações os íons de metais pesados podem formar complexos inespecíficos nas células, os quais são extremamente tóxicos. A concentração intracelular deve ser fortemente controlada através de mecanismos específicos de internalização (CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994; NIES, 1999). O cobre facilmente interage com radicais de oxigênio molecular, o que o torna, dessa forma, um elemento potencialmente tóxico, e dessa forma, muitos microrganismos são sensíveis ao metal. A toxicidade do metal baseia-se sobre a produção de radicais hidroperóxidos ou na interação com a membrana citoplasmática (WANG *et al.* 2003). Por outro lado, microrganismos resistentes à presença do cobre são relatados, surgindo o fenômeno de acumulação de íons metálicos nas células (NIES, 1999).

O presente trabalho não relata apenas a habilidade da linhagem UCP-542 de *C. elegans* em crescer na presença de cobre, como também demonstra o efeito estimulador do metal sobre o desenvolvimento das culturas, na medida em que o elemento pode eventualmente complexar-se aos componentes do meio de cultura.

As condições físicas do ambiente, como temperatura, pH, aeração, radiação, entre outras, também induzem respostas diferentes, como forma de adaptação ao meio ambiente, e portanto dizem respeito à sobrevivência celular (GARRAWAY & EVANS, 1984; GRIFFIN, 1994; JENNINGS, 1995). Fontes de carbono e fosfatos são fundamentais para o desenvolvimento de culturas de microrganismos. A glicose representa o combustível universal para as células, sendo uma fonte preferencialmente utilizada em relação aos demais carboidratos. O papel do fosfato é estudado em muitos tipos celulares. A sua presença/ausência no meio de cultivo induz respostas diferenciadas em função do organismo. Para alguns, é essencial para o crescimento, para outros, sua ausência não está diretamente associada à falta de crescimento. De um modo geral, a forma de estocagem corresponde a polifosfatos, polímeros lineares, com número de grupamentos distintos (JENNINGS, 1995; CAMPOS-TAKAKI, 2000; MCGRATH & QUINN, 2000).

No presente trabalho o consumo de glicose adicionada ao meio de cultura, apresentou-se diferente, em função da presença do íon metálico. Os resultados demonstraram a exaustão da glicose de forma mais efetiva em presença do metal, com diminuição de 17,9% do consumo para a cultura controle.

Ainda neste trabalho foi possível verificar que a presença do cobre no meio de cultivo causa um consumo menor do fosfato em relação à cultura controle no

início do cultivo. Os resultados apontam para um consumo mais lento no início do cultivo em presença do cobre. Contudo, a partir de 24 horas de crescimento o consumo do fosfato aumenta para a cultura em presença do metal. A partir de 36 horas ocorreu exaustão para ambas as culturas.

Alguns relatos apontam a relação entre componentes do meio, como fontes carbono, nitrogênio e fosfato e o processo de utilização e crescimento em presença de metais pesados. De modo geral, os microrganismos avaliados exibiram redução da biomassa quando cultivados em presença de íons metálicos, mesmo em baixas concentrações, ocorrendo inibição do crescimento e indução de acumulação do metal (SING & YU, 1998; DONMEZ & AKSU, 2001).

A literatura revela que microrganismos com habilidade de acumular polifosfato podem ser utilizados na biorremediação de efluentes contaminados com metais pesados, haja visto, vários estudos demonstrarem a associação de grânulos de polifosfato com cátions e metais pesados. Em adição, a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência ou tolerância de alguns microrganismos a metais pesados reforça o seu potencial biotecnológico na remoção destes elementos (VAN-LOOSDRECHT *et al.*, 1997; MINO *et al.*, 1998; TORRES *et al.*, 1998; KEASLING *et al.*, 1999; KULAEV, 2000).

Os resultados obtidos revelaram que amostras cultivadas em meio contendo o íon metálico exibiram menores conteúdos do polímero durante as primeiras 36 horas de cultivo, indicando uma diminuição significativa no conteúdo de polifosfato em presença de cobre, onde aproximadamente 57% do polifosfato micelial é degradado em relação ao conteúdo de polifosfato do micélio controle. Por outro lado, a partir de 48 horas de crescimento a cultura controle exibiu

diminuição progressiva no conteúdo de polifosfato celular, enquanto que a amostra tratada com 48 horas de cultivo apresentou uma elevação de seu conteúdo, o que poderia representar um ponto de acumulação do polímero em presença do metal.

Alguns estudos apontam a ação do polifosfato na precipitação de metais, sendo o polímero um potencial candidato para processos de remoção de agentes poluidores em função de sua capacidade de quelação para metais divalentes (KEASLING & HUPF, 1996; KEASLING *et al.*, 1999). Tem sido proposto que as células utilizam polifosfato para detoxificar metais apenas quando os íons são internalizados. Paralelamente, é sugerido que o polifosfato presente na superfície das células pode ser importante na quelação de metais. Contudo, evidências mais recentes sugerem que o polifosfato é degradado durante o crescimento em presença de metais (KEASLING *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1996).

A habilidade de síntese e degradação do polifosfato, determinada em procaríotos, é importante para o surgimento do fenômeno de tolerância a metais pesados, em contraste com os dados que sugerem que apenas altos conteúdos intracelulares do polifosfato determinam o fenômeno (KEASLING & HUPF, 1996). Os dados obtidos neste estudo revelam o fenômeno de degradação de polifosfato no micélio de *C. elegans* em presença do metal em relação ao micélio cultivado em ausência do íon metálico. Associando o conteúdo de polifosfato e a biomassa observou-se que ocorre diminuição do polifosfato e aumento significativo na biomassa produzida pelas culturas em presença de cobre. A biomassa da cultura controle representa 40% daquela observada para a biomassa da cultura tratada. O que sugere a utilização do polímero para o crescimento celular.

A literatura revela que existem diferentes enzimas envolvidas no metabolismo do fosfato e sua forma de reserva nas células. Contudo, os modelos estabelecidos determinaram as enzimas fosfatases (fosfohidrolases não específicas), exopolifosfatases, endopolifosfatases e polifosfato cinases. Dessa forma, alguns estudos apontam que tais enzimas que podem ter sua expressão induzida como resposta as condições ambientais de fosfato, pH, nitrogênio, entre outros, e estágio de crescimento (KORNBERG, 1995; NESMEYANOVA, 1999). As fosfatases especificamente associam-se aos fenômenos de captação do ortofosfato do meio. Geralmente, pequenas concentrações ou a ausência de fosfato no meio induzem aumento na expressão das enzimas (NESMEYANOVA, 1999).

Neste estudo, verificou-se que *C. elegans* não exibe atividade para fosfatase ácida, contudo, uma diferença significativa na atividade da fosfatase alcalina foi observada entre as culturas controle e tratadas com metal pesado. Uma diminuição de 75% na atividade foi detectada nas amostras obtidas das culturas cultivadas em presença de cobre. Os dados apresentados representam os primeiros para o fungo em questão.

Adicionalmente, os dados obtidos para o consumo do fosfato do meio de cultivo não determinam uma diferença entre a cultura controle e a tratada. Dados compatíveis com os achados de BRAIBANT & CONTENT (2001).

Em *Escherichia coli* a atividade da fosfatase alcalina está relacionada ao processo de acumulação e não degradação do polifosfato intracelular (NESMEYANOVA, 1999).

Outros trabalhos demonstram os efeitos de outros metais sobre atividades enzimáticas, fosforilação oxidativa, taxas fotossintéticas, permeabilidade e integridade da membrana celular e síntese de proteínas. É importante ressaltar que diversos fatores ambientais influenciam na toxicidade de metais pesados, pode-se destacar o pH, o suprimento de nutrientes e oxigênio, presença de outros íons metálicos e agentes quelantes e a concentração celular (WOOD & CLARCK, 1988; HUGHES & POOLE, 1989; VALDMAN & LEITE, 2000).

Neste estudo o aumento da utilização do polifosfato pelas culturas tratadas não apresentam relação com a atividade da enzima.

Microrganismos exibem habilidades de bioconversão em função do contato com inúmeros compostos presentes em seus ambientes naturais. Apenas recentemente, bactérias e fungos têm sido considerados como elementos fundamentais na biogeoquímica de metais. Por essa razão, o entendimento das respostas dos microrganismos a metais tem sido explorada, como um potencial alternativo, biotecnológico para a recuperação e descontaminação de íons metálicos. A captação e acumulação de metais por microrganismos podem ocorrer de modo dependente e não dependente do metabolismo (HUGHES & POOLE, 1989; TOBIN *et al.*, 1994; CERVANTES & GUTIERREZ - CORONA, 1994; KAPOOR *et al.*, 1999).

Considerando o potencial de *C. elegans* como agente para a redução de xenobióticos, a presente proposta também avaliou o seu potencial de remoção de cobre. Os resultados apresentados sugerem que ocorre a retirada do íon metálico pelo micélio da amostra ao longo do crescimento, pois há diminuição da

concentração do metal no meio avaliado por espectrofotometria de absorção atômica.

A literatura revela que a captação de íons de metais pesados através da membrana celular e sua acumulação intracelular são dependentes do metabolismo, ou seja, ocorrem somente em células vivas, capazes de gerar energia. Contudo, a remoção de íons metálicos por este tipo de mecanismo é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físico-química. Em contrapartida maiores quantidades de metal podem ser acumuladas. A quantidade de fontes de energia, presença de inibidores metabólicos, temperatura e luminosidade são os principais fatores que afetam este tipo de acumulação (GADD, 1988).

Neste trabalho não foi observada uma relação direta entre as fontes de carbono e fosfato e a habilidade de remoção do metal, contudo uma relação entre presença do íon metálico e o polifosfato intracelular foi detectada. Em presença de cobre ocorreu degradação do polímero de forma significativa. Em adição a degradação enzimática ativa, a biomassa microbiana também contribui para a remoção eficiente de metais pesados, presentes no meio ambiente. Nesse processo, o micélio funciona como agente adsorvente para o íon metálico. A aplicação direta da célula viva como biossorvente de metais pesados não parece promissora devido à resistência das células, o que resultou em inúmeros estudos utilizando micélio morto ou inativado, sob condições experimentais controladas (GADD, 1988; 2000; BRIERLEY, 1993; GOMES, 1998).

Processos contínuos e em batelada utilizando células vivas de culturas puras têm sido estudados. Os resultados sugerem que a superfície dos

microrganismos, constituída basicamente por polissacarídeos, desempenha papel essencial na captação de íons metálicos. Microrganismos produtores de exopolissacarídeos apresentaram bons resultados na captação de cobre e cádmio, respectivamente (GADD, 1988; 2000; BRIERLEY, 1993; GOMES, 1998).

Alguns estudos demonstram o emprego de fungos filamentosos, isolados de solos contaminados, na remoção de íons metálicos. Nestes estudos a biomassa é utilizada em seu estado natural ou modificada por tratamentos físicos e/ou químicos, de modo a aumentar a eficiência da absorção. Estudos relacionados ao crescimento em presença de metais são escassos (CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994; VOLESKY & HOLAN, 1995; LLOYD & LOVLEY, 2001).

Mesquita (1993) avaliou os principais mecanismos pelos quais microrganismos podem captar metais de soluções aquosas e apontou a sua relação com o metabolismo celular. Verificou-se que alguns metais podem ou não depender do metabolismo para sua remoção, onde são observados mecanismos de remoção de precipitação na superfície celular por ação enzimática, adsorção na membrana e parede celular, adsorção a polissacarídeos extracelulares e acumulação intracelular.

Considerando que a acumulação de metais pesados, por mecanismos independentes do metabolismo celular, se dá através de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, a presente proposta avaliou o comportamento da estrutura fina de *C. elegans*, submetida ao crescimento em presença de cobre, através da microscopia eletrônica de varredura. Houve diferenças associadas ao padrão de formação de

clamidósporos, forma da hifa, e eletrondensidade entre amostras cultivadas na presença e ausência do cobre. Estes são primeiros relatos associados aos efeitos do cobre sobre a ultraestrutura de *C. elegans* cultivada em presença de cobre. A utilização da microscopia eletrônica de varredura tornou possível à análise de aspectos da estrutura fina de fungos, o que ocasionou a geração de informações adicionais, as quais associadas: a bioquímica, a genética e a fisiologia introduziram novas perspectivas quanto ao funcionamento da célula fúngica (KLOMPARENS, 1990).

A literatura revela inúmeros trabalhos associados à análise da estrutura fina de fungos relacionados a forma e textura de hifas, esporangiogenese, aspectos gerais de esporos e à ligação parasita-hospedeiro (HAWKER & ABBOTT, 1963; BRACKER, 1968; BARTNICKI-GARCIA, 1968a, 1968b; YOUNG, 1969; COLLINS *et al.*, 1993). Contudo trabalhos associados aos efeitos de metais sobre micélio de fungos não são relatados.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o isolado UCP-542 de *C. elegans* exibe potencial para a exploração na remoção do cobre. Estudos associados à cinética e ao equilíbrio do fenômeno de sorção micelial devem ser aprofundados.

## 7. CONCLUSÕES

- O isolado de *C. elegans* (UCP – 542) apresenta habilidade de crescer em presença de cobre na concentração de 2 mM;
- O cobre não influenciou o consumo de glicose e fósforo, durante o crescimento;
- O isolado de *C. elegans* (UCP – 542) utilizado neste estudo é capaz de utilizar polifosfato como resposta à presença de cobre no meio de cultivo;
- O isolado de *C. elegans* (UCP – 542) não apresenta atividade fosfatase ácida nas condições estudadas;
- O isolado de *C. elegans* (UCP – 542) exibe atividade fosfatase alcalina sendo a expressão desta atividade influenciada negativamente pelo crescimento em presença do cobre;
- O isolado de *C. elegans* (UCP – 542) foi capaz de remover cobre no meio de cultivo;
- A análise ultraestrutural do micélio de *C. elegans* (UCP – 542) quando cultivado na presença e ausência do metal pesado cobre, revelou variações associadas a textura e forma da hifa, presença de clamidosporos, forma e tamanho de clamidosporos, eletrondensidade e ramificações através de microscopia eletrônica de varredura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. - Introductory Mycology. New York, **Jonh Wiley & Sons publishers**, 1996.

AOKI J & NIREUBERJ H. I. - *Fusarium globosum* from Subtropical Japan and the Effect of Different Light Conditions on its Conideogenesis. **Mycoscience**, Tokyo, 40 : 1- 9, 1999.

BAIJAL, U. & MEHROTRA, B. S. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. **Sydowia**. 33 : 1-13, 1980.

BARKAY, T. & SCHAEFER, J. – Metal and radionuclide bioremediation: issue, considerations and potentials, **Current Opinion Biotechnology**. 4 : 318 – 323, 2001.

BARTINICKI-GARCIA, S. - Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. **Annual Reviews in Microbiology**, 22 : 87 - 108, 1968a.

BARTNICKI-GARCIA, S., NELSON N., COTA ROBLES, E. - Electron Microscopy of Spore Germination and Cell Wall Formation in *Mucor rouxii*. **Archives of Microbiology**. 63 : 242 - 255, 1968b.

BRAIBANT, M. & CONTENT, J. – The cell surface associated phosphatase activity of *Mycobacterium bovis* BCG is not regulated by environmental inorganic phosphate, **FEMS Microbiology Letters**. 195 : 121 – 126, 2001.

BRACKER, C.E. - The Ultrastructure and Development of Sporangia in *Gilberteria persicaria*. **Mycologia**. 60 : 1016 - 1067, 1968.

BRARKER, A. V. & BRYSON, G. M. – Bioremediation of Heavy Metal and Organic Toxicants by Composting. **The Scientific World Journal**. 2 : 407 – 420, 2002.

BRIERLEY, C. L. – Metal immobilization using bacteria. **Microbiology Mini Recovery**. New York, 303 – 323, 1993.

BROWN, E.D.; YADA, R. Y.; MARANGON, A. G. – The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in aerosol – OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. **Biochemica et Biophysica Acta**. 1161: 66 -72, 1993.

CAMPOS –TAKAKI, G. M. – Presence of inorganic polyphosphste in Mucorales fungi. **Annual Publisher of Resarch Center for Pathogenis Fungi and Microbial Toxicosis**. Chiba University, Japan, 2000.

**CARLILE, M.J & WATKINSON, S.C.** The Fungi. Tokyo, Academic press., 1996.

CERNIGLIA, C.E. & GIBSON, D.T. – Metabolism of naphthalene of *Cunninghamella elegans*. **Applied Environment Microbiology**. 34 : 363 -370, 1977.

CERVANTES, C. & GUTIERREZ-CORONA, F. - Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. 14 : 121 – 138, 1994.

CERTIK, M.; BALTESZOLA, L; SAJBIROX, J. – Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. **Letters in applied Microbiology**. 25 : 101 – 105, 1997.

COATES, J. D. & ANDERSON, R. T. – Reviews, Emerging Techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments, **Tibtech**, v. 18, 2000.

COLLINS, S.P.; POPE, R.K.; SCHEETZ, R.W.; RAY, R.I.; WAGNER, P.A. & LITTLE, B.J. - Advantages of Environmental Scanning Electron Microscopy in Studie of Microorganisms. **Microscopy Research and Tecnique**. 25 : 398-405, 1993.

CONAMA – Conselho de Política Ambiental. Deliberação Normativa nº20, **Diário Oficial da União**. 11356-11357 , 30 de julho de 1986.

DERMOURNI, H. – A rare zygomycosis due to *Cunninghamella bertholletia*. **Mycosen**. 36 : 9 – 10, 1993.

DE SOUZA, W. - Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 21-47 : 134, 2000.

DIETRICH, S.M.C. Presence of polyphosphate of low molecular weight in Zygomycetes. **Journal of Bacteriology**. 127 : 1408-1413, 1976.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. – Compendium of soil fungi, **Academic Press**. 1: 120, 1980.

DONMEZ, G. & AKSU, Z. – Bioaccumulation of Cooper (II) and Nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. - **Water Research**. 35: 1425 – 1434, 2001.

DUBE, H.C. - A Textbook of Fungi, Bacteria and Viruses. **Vikas Publishing House Put Ltda**, 1978, 239 p.

ELLIOTT, S.; CHANG, C.; SCHWEINGRUBER, M.E.; SCHALLER, J.; RICKLI, E. E.; CARTON, J. – Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe* . **Journal Biology Chemical**. 261: 2936 – 2941, 1986.

ENDO, A.; TAKESHIMA, H.; KUWABARA, K. - Acetil CoA Carboxylase Inhibitors From the Fungus *Gongronella butleri*. **The Journal of Antibiotics**, XXXVIII, p. 599 - 604, 1985.

FELLENBERG, G. - Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental. **Ed. Pedagógica e Universitária**. São Paulo. 1990.

FERRIS, J. P.; FASCO, M. J.; STYLIANOPOULOU, F. L.; JERINA, D. M.; DALY, J. W.; JEFFERY, A. M. - Monooxygenases activity in *Cunninghamella bainieri*. Evidence for a fungal system similar to liver microsomes. **Archive Biochemistry Biophysical**. 156 : 97 – 103, 1973.

FISKE, C. H. & SUBBAROW – The colorimetric determination of phosphorus. **Journal Biology Chemical**. 66 : 375 – 400, 1925.

FOSTER, B. C.; LISTER, D. L.; ZAMECNIK, J.; COUTTS, R. T. - The biotransformation of tranlycypromine by *Cunninghamella equinulata*. **Canadian Journal of Microbiology**. 37 : 791-795, 1991.

FU, Y. & VIRARAGHAVAN, T – Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. 82 : 139 – 145, 2002.

GADD, G. M. – Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: Biotechnology – A comprehensive Treatise (H. J. Rehm, ed.). **VCH Verlagsgesellschaft**, Weinheim, p. 401 – 433, 1988.

GADD, G. M. – Bioremedial Potential of Microbial Mechanisms of Metal Mobilization and Immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**. 11 : 271 – 279, 2000.

GARRAWAY, M. O. & EVANS, R.C. - Fungal Nutrition and Physiology. **John Willey & Sons Incorporation publishers**, 1984, 401 p.

GOLD-STEIN, A. H.; DANON, A. ; BAERTLEIN, D. A. ; McDANIEL, R. G. – Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. **Plant Physiology**. 87 : 711 – 715, 1988.

GOMES, N.C.M.; MENDONÇA ; HAGLER, L.C.S.; SAVAIDIS, I. – Metal Biorremediation by Microorganisms. **Ver. de Microbiology**. 29 : 85 - 92, 1998.

GOMES, P. F.; NASCIMENTO, A. E.; OKADA, K.; MESSIAS, A. S.; SHARIA, A. E. N.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. – Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. **International Conference – Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and prospects**. p. 82, 2000.

GREENFIELD, N. J.; HUSSAIN, M.; LENARD, J. – Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a P-nuclear magnetic resonance study. **Biochimica et Biophysica Acta**. 926 : 205 – 214, 1987.

GRIFFIN, D. H. - Fungal Physiology. **John Willey & Sons Incorporation Publishers**, 1994, 458 p.

HAROLD, F. M. – Inorganic Polyphosphate in biology: structure metabolism and function. **Bacteriological Reviews. dec.**, p. 772 – 794, 1966.

HAWKER, L.E. & ABBOTT, P. Mc.V. - An Electron Microscope Study of Maturation and Germination of Sporangiospores of Two Species of *Rhizopus*. **Journal of General Microbiology**, 32 : 295 - 298, 1963.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. W. – Clinical chemistry, principles and technics. **2<sup>nd</sup>. Ed. New York, Harper & Row**, 1974.

HESSELTINE, C. W. & ANDERSON, R.F. - Microbiological Production of Carotenoids. I. Zygosporos and Carotene Produced by Interspecific and Crosses of *Choanephoraceae* in Liquid Media. **Mycologia**, 49 : 449 - 452, 1957.

HOLAN, K. R. & VOLESKY, B. – Biosorption of lead and nickel by biomassa of marine algae. **Biotechnology Bioengineer.** 43 : 1001 – 1009, 1994.

HUGHES, M. N. & POOLE, R. K. - Metals and Microorganisms. **Chapman and Hall Ltda.**, Londres, 1989.

JENNINGS, D. H. - The Physiology of fungal nutrition. **Cambridge University press**, 1995.

JONES, J.K; STRATFORT, J.A; WATHERHOUSE, K.S.; VOGT, N.B. – Organic contaminants in welsh soils: polyinuclear aromatics hydrocarbons. **Environmental Science Technology**. 23 : 540 – 550, 1989.

KANA-UCHI, A & KUKATSUI, T. - Light Induced Fruit Body Formation of na Entomogenous Fungus *Paecilomyces termipes*. **Mycoscience**. 40 : 349-351, 1999.

KAPOOR, A. & VIRARAGHAVAN, T. – Fungal Biosorption – na alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**. 53 : 195 – 206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. – Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, 70 : 95 – 104, 1999.

KEASLING, J. D. & HUPF, G. A – Genetic Manipulation of Polyphosphate Metabolism affects Cadmium Tolerance in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. 743 – 746, 1996.

KEASLING, L.D; VAN DIEN, S.J; TRELSTAD, P; RENNINGER, N; MCMAHON, K. -Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**. **Moscou**, Mar; 65(3) : 324-331, 1999.

KIHARA, J.; WATANABE, Y.; HONDA, Y. - Suppression and Reactivation of UV-Induced Sporulation by Blue Light in *Bipolaris oryzae*. **Mycoscience**, 40 : 363 - 366, 1999.

KITAMOTO, Y.; AKITA, K.; HORIKOSHI, T. - Effects of High-Temperature Treatment on Two Essential Light Processes and na Intervening Dark Process in Photoinduced Pileus Primordium Formation of a Basidiomycete, *Favolus arcularius*. **Mycoscience**, Tóquio. 40 : 103 - 108, 1999.

KLOMPARENS, K. L. - The Development and Application of Ultrastructural Research in Mycology. **Mycopathologia**, 109 : 139 - 148, 1990.

KONTOYIANIS, D. P.; VARTIVARIAN, S.; ANNAISSIE, E. J.; SAMONIS, G.; BODEY, G. P.; RINALDI, M. – Infections due to *Cunninghamella bertholletia* in patients with cancer. Report of three cases and review. **Clinical Infect diseases**. 18 : 925 – 928, 1994.

KORNBERG, A. – Inorganic polyphosphate: toward marking a forgotten polymer unforgettable. **Journal of Bacteriology**. 177: 491 – 496, 1995.

KORNBERG, A; RAO, N.N; AULT-RICHE, D. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. **Annual Review Biochemical**. 68 : 89-125, 1999.

KULAEV, I & KULAKOVSKAYA, T. Polyphosphate and Phosphate Pump. **Annual Review Microbiology**. 54: 709-734, 2000.

KULAEV, I. S. - Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. *Biochemistry*. **Moscou**. 65(3) : 269 - 270, 2000.

KUMBLE, K.D & KORNBERG, A. - Inorganic Polyphosphate in Mammalian Cell and Tissues. **Journal Biology Chemistry**. Mar 17; 270 (11) : 5818 - 5822, 1995.

LAMACKA, M. & SAJBIDOR, J. - The content of prostaglandins and their precursors in *Mortierella* and *Cunninghamella* species. **Letters of Applied Microbiology**, 26 : 224 – 226, 1998.

LEFEBVRE, D. D.; DUFF, S. M. G.; FIFE, C. A.; JULIEN-INALSINGH, C.; PLAXTON, W.C. – Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cell. **Plant Physiology**. 93 : 504 – 511, 1990.

LEHRER, R.I.; HOWARD, D.H.; SYPHER, P.S.; EDWARD, E.S.J.E.; SEGAL,G.P.; WINSTON, D.J - Mucormycosis. **Annual of Interne Medicine**. 93 : 93-108, 1980.

LEVY, S. A; SCHMIFF, K.W.; KAUFMAN, L. - Systemic zygomycosis diagnosed by fine needle aspiration and confirmed with enzyme immunoassay. **Chest**. 90 : 146-148, 1986.

LINCH, J. M. – Biotecnologia do Solo. Fatores microbiológicos na produtividade agrícola. **Editora Manole Ltda.** São Paulo, p. 209, 1986.

LLOYD, J.R. & LOVLEY, D.R. – Microbial detoxification of metals and radionuclides. **Current Opinion Biotechnology.** 12 : 248 – 253, 2001.

LLOYD, J.R.. – Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. **Microbiology today**, v. 29, 2002.

LOVLEY, D.R. & COATES J.D. – Biorremediation of metal contamination – **Current Opinion Biotechnology.** 8 : 285 – 289, 1997.

MCGRATH, J. W. & QUINN, J. P. – Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. **Applied and Environmental Microbiology.** 66, (9) : 4068 – 4073, 2000.

MESQUITA, L. M. S. - Remoção de ions cádmio de soluções por *Micrococcus luteus*. **Tese de Mestrado.** Rio de Janeiro: UFRJ, 1993.

MINO, T; VANLOOSDRECHT, M.C.M; HEIJNEN, J. J. - Microbiology and Biochemistry of The enhanced Biological Phosphate Removal Process. **Water Research.** 32 : 3193 - 3207, 1998.

NESMEYANOVA, M. A. – Review: Polyphosphates and Enzymes of Polyphosphate Metabolism in *Escherichia coli*. **Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms**, Russia Academy of Science, 1999.

NG, T. T. C ; CAMPBELL, C. K.; ROTHERA, M.; HOUGHTON, J.B.; HUGHES, D.; DENNING, D. W. – Successful treatment of sinusitis caused by *Cunninghamella bertholletia*, **Clinical Infect.** 19 : 313 – 316, 1994.

NIES, D. H. – Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology.** 51 : 730 – 750, 1999.

O'DONNELL, K. L. - Zygomycetes in culture. **University of Georgia.** v. 257, 1979.

ORLOWSKI, I. M. - *Mucor* Dimorphism. **Microbiology Reviews.** 55 : 234-258, 1991.

OSMANI, A. & SCRUTTON, M. C. – The sub-cellular localizations and regulatory properties of pyruvate carboxylases from *Rhizopus arrhizus*. **European Journal of Biochemistry.** 147 : 119 – 128, 1985.

PARALES, R. E.; BRUCE, N. C.; SCHMID, A.; WACKETT, L. P. – Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3), **Applied and Environmental Microbiology.** 68 : 4699 – 4709, nº 10, 2002.

PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; dA CUNHA, C. D.; MESQUITA, L. M. S. – Aplicação de Microorganismos no Tratamento de Resíduos: a remoção de metais pesados de efluentes líquidos, **Revista Científica e Cultural da Universidade Estácio de Sá**. Cap. 09, 2002.

POTHULURI, J.V.; FREEMAN, J. P.; EVANS, F.E.; CERNIGLIA, C. E. - Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**. 58 : 3654 – 3659, 1992.

POTHULURI, J.V.; DOERGE, D. R.; CHURCHWELL, M. I.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. - Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. 53 : 153-174, 1998a.

POTHULURI, J.V.; SUTHERLAND, J. B.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. - Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. **Applied Environmental Microbiology**. 64 : 3106 – 3109, 1998b.

REDDY, C. S.; ACOSTA, D.; DAVIS, P. J. - Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its O-alkyl homologues with *Cunninghamella* species. **Xenobiotica**. 20 : 1281-1297, 1990.

RIAZ-UL-HAQ & SHAKOORI, A. R. – Microorganisms resistant to heavy metals and toxic chemicals indicators of environmental pollution and their use in bioremediation. **Folia Biol** (Krakow). 48 : 143 – 147, 2000.

SCHURR, A. & YAGIL, E. – Regulation and Characterization of Acid and Alkaline Phosphatase in Yeast. **Journal of General Microbiology**. 65 : 291 – 303, 1971.

SCHWARTZ, H.; LIEBIG WEBER, A.; HOCHSTATTER, H.; BOTTCHER, H. - Microbial oxidation of ebastine. **Applied Environmental Microbiology**. 44 : 731-735, 1996.

SHIPTON, W. A & LUNN, J. A. - Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. **Transactions of British Mycological Society**. 74 : 483 – 491, 1980.

SING, C. & YU, J. – Cooper adsorption and removal from water by living mycelium of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Elsevier Science**, 9 : 2746 – 2752, 1998.

TADANO, T. & SAKAI, H. – Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus – deficient conditions. **Soil Science Plant Nutrient**. 37 : 129 – 140, 1991.

THAM, L.; X.; MATSUHASHI, S.; KUME, T. - Growth and Fruit Body Formation of *Gracioderma lucidum* on Media Supplemented with Vanadium, Selenium and Germanium. **Mycoscience**. Tokyo. 40 : 87 - 92, 1999.

TIBBETT, M.; GRANTHAM, K.; SANDERS, F.E.; CAIRNEY, J.W.G. – Induction of cold active acid phosphomonoesterase activity at low temperature in psychrotrophic ectomycorrhizal *Hebeloma spp.*. **Mycology Research**. 102 : 1533 – 1539, nº 12, 1998.

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. – Metal accumulation by fungi: Applications in Environmental biotechnology. **Journal Industry Microbiology**. 13 : 126 – 130, 1994.

TOMBS, M.P. & BLAKE, G.G. - Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. **Biochimia et Biophysica Acta**. 700 : 81-89, 1982.

TORRES, M.; GOLDBERG, J.; JENSEN, T. E. – Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (cyanophyceae). **Microbios**, 96 : (385)141 – 147, 1998.

TRUDEL, J. & ASSELIN, A. – Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. 189 : 249 – 253, 1990.

USPHS – Toxicological profile for copper on CD-ROM. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **U. S. Public Health Service**, 1997.

UNZ, R. F. & SHUTTLEWORTH, K.L. – Microbial Mobilization and immobilization of heavy metal. **Current Opinion Biotechnology**. 7 : 307 – 310, 1996.

VALDMAN, E. & LEITE, S.G.F. - Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum sp.* waste biomass. **Bioprocess Engineer**. Nova York. 22 : 171-173, 2000.

VAN LOOSDRECHT, M.C.; SMOLDERS G.J.; KUBA, T.; HEIJNEN, J.J. - Metabolism of Microorganisms Responsible for Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 71 (1-2) : 109-116, 1997.

VIEIRA, R. H. S. F. & VOLESKY, B. – Biosorption: a solution to pollution?. **Internatl Microbiol**. 3 : 17 – 24, 2000.

VILLEN, R. A. – Biotecnología – Histórico e Tendências, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, 2003.

VOLESKY, B. & HOLAN, Z. R, - Review Biosorption of Heavy Metals. **Biotechnology Program**. 11 : 235 – 250, 1995.

WANG, L.; CHUA, H.; ZHOU, P. K.; WONG, S. N.; SIN, S. N.; LO, W. L.; YU, P. H. – Role of cell surface components on Cu<sup>2+</sup> adsorption by *Pseudomonas putida* 5 – x isolated from electroplating effluent. **Water Research**. 37 : 561 – 568, 2003.

WEITZMAN, I.; WHITTIER, S.; MCKITRICK, J. C.; DELLA-LATTA, P. - Zygosporangium: The Last Word in Identification of Rare and Atypical Zygomycetes Isolated from Animal Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 33 : 781-783, 1995.

WOOD, H.G & CLARCK, J.E. - Biological Aspects of Inorganic Polyphosphates. **Annual Reviews of Biochemistry**. 57 : 253-260, 1988.

XIANG, L.; CHAN, L. C.; WONG, J. W. C. - Removal of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge by isolated indigenous iron-oxidizing bacteria. 41: 283 – 287, 2000.

ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J.E.; CERNIGHIA, C.E. – Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS microbial letters**. 138 : 221 – 226, 1996.

ZOUBOULIS, A. I. & KATSOYIANNIS, I. A. – Recent advance in the bioremediation of metal contaminated groundwaters. **2<sup>nd</sup> European Bioremediation Conference**, Greece, 2003.

YAZAKI, J.; JOH, T.; TOMIDA, S.; HAYAKAWA – Acid phosphate-deficient condition in *Pholiota nameko*, **Mycoscience**. 38 : 347 – 350, 1997.

YOUNG, T.W.K. - Electron and Phase-Contrast Microscopy of Spores in Two Species of Genus *Mycotypha* (Mucorales). **Journal of General Microbiology**. 55 : 243-249, 1969.