

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEITO DO PIRENO NO CRESCIMENTO, NA MORFOLOGIA E NA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM *Rhodotorula* sp**

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

RECIFE

2010

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

**EFEITO DO PIRENO NO CRESCIMENTO, NA MORFOLOGIA E NA
PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM *Rhodotorula sp***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, nível Doutorado, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento

RECIFE

2010

Marinho, Petrusk Homero Campos

Efeito do Pireno no crescimento, na morfologia e na produção de enzimas em *Rhodotorula sp* / Petrusk Homero Campos Marinho. – Recife: O Autor, 2010.

110 folhas : il., fig.

Orientador: Galba Maria de Campos-Takaki.

Co-orientador: Aline Elesbão do Nascimento

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Rhodotorula 2. Pireno 3. Enzima I. Título.

579.59 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-99

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

Efeito do Pireno no crescimento, na morfologia e na produção de enzimas em *Rhodotorula*

A Comissão Examinadora da Defesa, do Exame da Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública, realizada a 03 / 03 / 2009, considerou o candidato:

(X) **Aprovado** () **Reprovado**

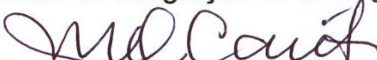
Examinador(a):

.....
Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Federal de Pernambuco / UFPE

Examinador(a):

.....
Prof. Dr. Ricardo Kenji Shiosaki
Faculdade de Integração do Sertão / FIS

Examinador(a):

.....
Profa. Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco / UFPE

Examinador(a):

.....
Profa. Dra. Maria Aparecida Resende
Universidade Federal de Minas Gerais / UFMG

Examinador(a):

.....
Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco / UFPE

*“Não chores, meu filho; não chores, que a vida é luta renhida; viver é lutar. A vida é combate, que aos fracos abate, que os fortes, os bravos, só pode exaltar...
A arma ensaia, penetra na vida: pesada ou querida, viver é lutar. Se o duro combate, aos fracos abate; aos fortes, aos bravos, só pode exaltar”. (Gonçalves Dias)*

Dedico,

Ao Grande Arquiteto do Universo - Deus e ao Nosso Senhor Jesus Cristo.

Aos meus pais, Pedro Simões Marinho da Silva e Kátia Natércia Campos de Carvalho Marinho pela vida, dedicação, carinho, ensinamentos e AMOR INCONDICIONAL.

À Raquel, minha esposa, Kaline Tatiane, minha irmã, e aos meus sobrinhos Luan, Pedro e Théo pelo mesmo sentimento, a virtude por excelência, e único nome que pode substituir o sagrado Nome de Deus - AMOR.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação e oportunidade e, por ter sido decisiva na minha formação pessoal e acadêmica.

À Profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento, pela co-orientação, atenção e amizade durante todo esse tempo em que convivemos e trabalhamos juntos.

Ao meu irmão e amigo do coração Ricardo Kenji Shiosaki pela amizade e companheirismo de longa data.

À Patrícia Mendes e Marcos Lima pela amizade e constante colaboração no transcorrer deste trabalho.

Ao Sr. Renivaldo, Sra. Cosma e Joran pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

À Sra. Adenilda, secretária da Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelo carinho e ajuda sempre presente.

Aos técnicos do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Sr. Humberto, Sr. Salatiel (*in memorian*) e a Sônia Maria, pela solicitude e presteza dos seus serviços.

À Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Reitor Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais.

Aos professores do Doutorado em Ciências Biológicas pela atenção e conhecimentos transmitidos.

À CAPES pela concessão da Bolsa de Doutorado e ao CNPq, FINEP, PRONEX pelo suporte técnico e financeiro na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Petróleo: Histórico e Origem	17
2.1.2. A Química do Petróleo: Tipos e Composição	17
2.1.3. O Petróleo no Meio Ambiente	19
2.1.4. Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	21
2.2. Aspectos Toxicológicos dos HAPs	23
2.3. Biodegradação dos Hidrocarbonetos derivados do Petróleo	25
2.4. Microrganismos degradadores de HAPs	27
2.5. O Gênero <i>Rhodotorula</i>	28
2.6. Enzimas Ligninolíticas: A Lacase e a Manganês Peroxidase (MnP)	29
2.7. Morfologia e Ultraestrutura	31
3. REFERÊNCIAS	32
Primeiro Artigo: Efeito do Pireno sobre o crescimento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	46

Segundo Artigo: Expressão da Lacase e Manganês Peroxidase (MnP) produzidas por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> em presença de Pireno	62
---	-----------

Terceiro Artigo: Comportamento Ultraestrutural de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> induzido pela presença do Pireno	83
---	-----------

**Primeiro Artigo: Efeito do Pireno sobre o crescimento de
*Rhodotorula mucilaginosa***

RESUMO	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Microrganismo	51
2.2. Substrato	51
2.3. Meios de Cultura	51
2.3.1. Meio de Manutenção	51
2.3.2. Meio de Crescimento	52
2.4. Métodos Micorbiológicos	52
2.4.1. Pré-Inóculo	52
2.4.2. Condições de Cultivo / Tratamento com Pireno	52
2.4.3. Determinação da Curva de Crescimento	52

2.4.4. Determinação da Velocidade Específica de Crescimento e do Tempo de Geração	53
2.4.5. Viabilidade Celular	53
2.5. Testes Bioquímicos	53
2.5.1. Determinação do pH	53
2.5.2. Determinação do Consumo de Glicose	54
3. RESULTADOS	54
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS	59
Segundo Artigo: Expressão da Lacase e Manganês Peroxidase (MnP) produzidas por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> em presença de Pireno	62
RESUMO	62
ABSTRACT	62
MATERIAL E MÉTODOS	67
Microrganismo	67
Substrato	67
Meios de Cultura	67
Meio de Manutenção	67
Meio de Crescimento	67
Métodos Microbiológicos	68

Pré-Inóculo	68
Condições de Cultivo / Tratamento com Pireno	68
Testes Bioquímicos	
Determinação do pH	68
Determinação das Proteínas Totais	68
Determinação das Atividades Enzimáticas	69
Extração líquido/líquido e análise CCD e HPLC	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
Terceiro Artigo: Comportamento Ultraestrutural de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> induzido pela presença do Pireno	83
RESUMO	85
ABSTRACT	86
1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1. Microrganismo	88
2.2. Substrato	88
2.3. Meios de Cultura	88
2.3.1. Meio de Manutenção	88
2.3.2. Meio de Crescimento	89
2.4. Métodos Microbiológicos	89

2.4.1. Pré-Inóculo	89
2.4.2. Condições de Cultivo / Tratamento com Pireno	89
2.5. Estudo Ultraestrutural	89
2.5.1. Técnica de Rotina	90
2.5.2. Citoquímica para Citocromo Oxidase	91
2.5.3. Citoquímica para Catalase	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1. Estudo Ultraestrutural	93
5. CONCLUSÕES	106
6. REFERÊNCIAS	106

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura de alguns hidrocarbonetos aromáticos causadores de poluição ambiental 22

Figura 2. Vias Catabólicas para utilização de hidrocarbonetos aromáticos por fungos não ligninolíticos e fungos ligninolíticos. Fonte: Cerniglia, 1997 28

PRIMEIRO ARTIGO

Figura 1. Efeito do Pireno sobre a Viabilidade Celular de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D). Viabilidade Celular (◇); Consumo de Glicose (□) 55

Figura 2. Efeito do Pireno sobre a variação de pH de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D) 56

SEGUNDO ARTIGO

Figura 1. Efeito do Pireno sobre o pH de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D) 86

TERCEIRO ARTIGO

Figura 1. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, Técnica de Rotina. A (Controle); B (0,25 mg/mL); C (0,5 mg/mL) e D (1 mg/mL). Parede Celular (▼); Membrana Citoplasmática (►); Vacúolos (●); Núcleo (◆); Corpos Eletrondensos (▲) 94

Figura 2. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, Citoquímica Enzimática para Citocromo Oxidase. A (Controle); B (0,25 mg/mL); C (0,5 mg/mL) e D (1 mg/mL). Parede Celular (▼); Membrana Citoplasmática (►); Vacúolos (●); Núcleo (◆); Corpos Eletrondensos (▲); Mitocôndrias (◄) 95

Figura 3. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, 96
Citoquímica Enzimática para Catalase. A (Controle); B (0,25 mg/mL); C
(0,5 mg/mL) e D (1 mg/mL). Parede Celular (▼); Membrana
Citoplasmática (►); Vacúolos (●); Núcleo (◆); Corpos Eletrondensos (
▲); Mitocôndrias (◄)

Figura 4. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. 99
Controle (A e A1), 0,25 mg / mL (B e B1); 0,5 mg / mL (C e C1) e 1,0 mg /
mL (D e D1). Incubados à 28°C, no período de 8 e 12 horas,
respectivamente. Aumento de 3000X. Blastoconídios (●); Células-filhas
(Brotos) (◆)

Figura 5. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. 100
Controle (A e A1), 0,25 mg / mL (B e B1); 0,5 mg / mL (C e C1) e 1,0 mg /
mL (D e D1). Incubados à 28°C, no período de 16 e 20 horas,
respectivamente. Aumento de 3000X. Blastoconídios (●); Células-filhas
(Brotos) (◆)

Figura 6. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. 101
Controle (A e A1), 0,25 mg / mL (B e B1); 0,5 mg / mL (C e C1) e 1,0 mg /
mL (D e D1). Incubados à 28°C, no período de 24 e 48 horas,
respectivamente. Aumento de 3000X. Blastoconídios (●); Células-filhas
(Brotos) (◆)

Figura 7. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. 102
Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D).
Incubados à 28°C, no período de 72 horas. Aumento de 3000X.
Blastoconídios (●); Células-filhas (Brotos) (◆)

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRO ARTIGO

Tabela 1. Parâmetros Cinéticos de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivado em presença e ausência de Pireno	57
--	----

SEGUNDO ARTIGO

Tabela 1. Atividade Enzimática de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> em diferentes concentrações de pireno. Controle (0); 0,25 mg/ mL; 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL. Proteínas Totais; Lacase; Manganês Peroxidase	73
Tabela 2. Quantificação do pireno residual em meio de cultura YMB cultivado com <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> suplementado com Pireno. N /D (Não Detectado)	76

RESUMO

Rhodotorula mucilaginosa UCP 1003 foi cultivada em meio de cultura Yeast Mold Broth (YMB) na ausência e presença de pireno nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. Diferenças foram observadas na viabilidade celular, velocidade específica de crescimento e tempo de geração, de acordo com as concentrações testadas e os intervalos de tempo de crescimento. Paralelamente, o comportamento do microrganismo foi avaliado quanto à atividade da expressão das enzimas Lacase (Lac) e Manganês Peroxidase (MnP). Os resultados obtidos revelaram diferenças relativas à expressão das mesmas nas diferentes concentrações de pireno testadas, com valores máximos de 1,83 UI / L e 0,76 UI / L, respectivamente. Através do estudo por cromatografia (HPLC) foi possível verificar que não houve detecção de pireno residual relacionadas às concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Por outro lado, foram verificados valores remanescentes de pireno na concentração de 1 mg/mL. A avaliação dos possíveis efeitos sobre a ultraestrutura do organismo com a utilização de técnicas de rotina e citoquímicas também foram realizadas. Os resultados revelaram diferenças quanto à forma, tamanho e eletrondensidade das células, bem como dos produtos de marcação e presença de organelas. Os resultados obtidos demonstram, pela primeira vez, os efeitos do pireno sobre a ultraestrutura deste fungo. Os dados sugerem que *Rhodotorula mucilaginosa* exibe potencial de uso em biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs).

Palavras-Chave: *Rhodotorula*, Enzimas, Ultraestrutura.

ABSTRACT

Rhodotorula mucilaginosa UCP 1003 was grown in culture medium Yeast Mold Broth (YMB) in the absence and presence of pyrene in concentrations of 0.25 mg / mL, 0.5 mg / mL and 1 mg / mL. Differences were observed in cell viability, specific growth rate and generation time, according to the tested concentrations and time intervals of growth. In parallel, the behavior of microorganism activity was assessed for the expression of enzymes Laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP). The results revealed differences in the expression of the same at different pyrene concentrations tested, with maximum values of 1.83 IU / L and 0.76 IU / L, respectively. By studying chromatography (HPLC) was able to verify that there was no detection of residual pyrene related to concentrations of 0.25 mg / mL and 0.5 mg / mL. Moreover, the remaining values were observed for pyrene at a concentration of 1 mg / mL. The evaluation of possible effects on the ultrastructure of the organism with the use of routine and cytochemical were also performed. The results revealed differences in shape, size and electron density of the cells, as well as product labeling and presence of organelles. The results demonstrate for the first time, the effects of pyrene on the ultrastructure of this fungus. The data suggest that *R. mucilaginosa* exhibits potential for use in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Keywords: *Rhodotorula*, Enzymes, Ultrastructure.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos ecossistemas terrestres e aquáticos, por compostos orgânicos tóxicos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), tornou-se um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo industrializado. Esses poluentes colocam em risco à saúde humana e apresentam a capacidade de se acumular nas diferentes cadeias tróficas (ALEXANDER, 2002; JOHNSEN et al., 2005; DALE et al., 2009).

Neste sentido, processos físicos e químicos no tratamento de xenobióticos são empregados, porém demonstram ser processos dispendiosos e podem resultar em novos problemas ambientais. Assim, a utilização de microrganismos na remediação de áreas contaminadas, têm-se revelado uma alternativa eficiente e econômica (FU & VIRARAGHAVAN, 2001; JAQUES et al., 2007).

Entre os microrganismos, os fungos filamentosos, e principalmente as leveduras, apresentam mecanismos que permitem degradar hidrocarbonetos e remover metais pesados, através dos seus mecanismos enzimáticos. A degradação de substâncias recalcitrantes como o fenol, por exemplo, por linhagens de *Rhodotorula creatinivora* e a remoção de metal pesado cádmio por *Rhodotorula* sp. Y11 têm sido descritos (KRALLISH et al., 2006; LI & YUAN, 2006).

Os fungos filamentosos não ligninolíticos utilizam o sistema enzimático citocromo P-450 monoxigenase na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), enquanto que os fungos ligninolíticos apresentam enzimas do complexo ligninolítico, lacases, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). Assim, os Basidiomicetos, fungos ligninolíticos, exibem a habilidade em transformar vários HAPs carcinogênicos e mutagênicos em metabólitos oxidados, hidroxilados e, posteriormente conjugados, com menor toxicidade (CERNIGLIA, 1997; BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

Dessa forma, devido ao fato desses organismos apresentarem potencial biotecnológico na produção de enzimas degradativas e os poucos relatos a respeito de sua capacidade de resistência / tolerância a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), esta pesquisa foi realizada com o intuito de ampliar os conhecimentos do potencial biotecnológico de *Rhodotorula mucilaginosa*,

microrganismo isolado de efluente petroquímico, no processo de produção de enzimas com potencial de degradação de pireno, bem como avaliar os efeitos deste xenobiótico sobre o crescimento e a estrutura celular, através dos seguintes objetivos:

- Investigar o efeito de diferentes concentrações de pireno na cinética de crescimento de *Rhodotorula mucilaginosa*;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de pireno na produção das enzimas degradativas, lacase e manganês peroxidase (MnP);
- Identificar e quantificar os produtos obtidos da degradação do pireno pelo catabolismo de *Rhodotorula mucilaginosa*;
- Investigar o comportamento ultraestrutural de *Rhodotorula mucilaginosa* durante o crescimento em meio contendo diferentes concentrações de pireno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Petróleo: Histórico e Origem

O petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma mistura complexa de compostos orgânicos, hidrocarbonetos. Explorado comercialmente desde meados do século 19, o petróleo foi usado, por muitas décadas, para a iluminação e, em menor escala, como lubrificante. A invenção do motor de combustão interna e sua adoção rápida em todas as formas de transporte ampliaram o emprego desse recurso natural, aumentando a demanda, e com isso a produção, o transporte, a estocagem e a distribuição tanto do óleo cru quanto de seus derivados. Ele se origina do betume das rochas-mãe, que determina as diferenças na sua composição básica, ou seja, sua composição varia em função da localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram (BALBA et al., 1998; PRINCE, 2002; LIANG et al., 2008).

2.1.2. A Química do Petróleo: Tipos e Composição

O Petróleo é considerado termodinamicamente metaestável sob condição geológica, pois apresenta em sua composição hidrocarbonetos que podem variar de uma simples molécula, como metano, a moléculas com alto peso molecular. Todas essas moléculas são compostas de carbono e hidrogênio, mas a maioria dos óleos contém uma pequena porcentagem de enxofre orgânico e traços de nitrogênio orgânico; podendo ser encontrado sob as formas gasosa, líquida ou sólida. Os diferentes componentes do petróleo são usualmente agrupados em frações, dependendo de suas propriedades físico-químicas. As principais frações são as parafinas, os cicloalcanos, os compostos aromáticos e uma fração asfáltica ou polar (TISSOT et al., 1978; BOSSERT & COMPEAU, 1995; BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

A fração considerada saturada compreende os n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicloalcanos. A fração aromática, correspondente aos compostos aromáticos, é formada por um ou mais anéis benzênicos, agrupados de forma linear, angular ou em grupos. O Petróleo é formado de hidrocarbonetos, compostos de

carbono e hidrogênio, apresentando vários arranjos e tamanhos diversos (LEAHY & COLWELL, 1990; REYNOLDS & SKIPPER, 2005; ARJA et al., 2009).

As moléculas menores, com um a quatro átomos de carbono, formam os gases; moléculas maiores, de quatro a cerca de dez átomos de carbono, constituem a gasolina; moléculas ainda maiores, de até cinquenta átomos de carbono, constituem os combustíveis leves e óleos lubrificantes; e as moléculas grandes, de várias centenas de átomos de carbono, compõem os combustíveis pesados, ceras e asfaltos. Por outro lado, junto aos hidrocarbonetos gasosos existem apreciáveis quantidades de nitrogênio, dióxido de carbono e ácido sulfídrico, além de pequena porção de hélio. Nos hidrocarbonetos líquidos em geral se encontram traços de oxigênio, enxofre, nitrogênio, combinados com suas moléculas. Os átomos de carbono unem-se as moléculas de hidrocarbonetos de duas maneiras diferentes: para formar compostos em forma de anel, hidrocarboneto cíclico, ou de cadeia, hidrocarboneto acíclico ou alifático. Além disso, cada átomo de carbono pode ser completado de maneira total ou apenas parcial por átomos de hidrogênio e assim formar, respectivamente, moléculas saturadas ou não saturadas (LEAHY & COLWELL, 1990; SUGIURA et al., 1997; LIANG et al., 2007).

O petróleo apresenta uma grande variedade de complexas estruturas moleculares. Independentemente das variações físicas ou químicas, podem apresentar de 82% a 87% de carbono e 12% a 15% de hidrogênio. Os asfaltos mais viscosos geralmente variam de 80% a 85% de carbono e de 8% a 15% de hidrogênio. O óleo cru pode ser agrupado em três séries químicas básicas: parafina, naftênica e aromática. A maioria dos óleos crus compõe-se de misturas dessas três séries em proporções variáveis. As séries parafínicas de hidrocarbonetos, também chamadas de série metano (CH_4), compreendem os hidrocarbonetos mais comuns entre os óleos crus. É uma série saturada de cadeias abertas com a fórmula geral $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$. As parafinas, líquidas à temperatura normal, entram em ebulição entre 40°C e 200°C, são os constituintes principais da gasolina. Os resíduos obtidos pelo refino de parafinas de baixa densidade são ceras parafínicas plásticas e sólidas. A série naftênica que tem fórmula geral C_nH_{2n} é uma série cíclica saturada. Constitui uma parte importante de todos os produtos líquidos de refinaria, mas forma, também, a maioria dos resíduos complexos das faixas de pontos de ebulição mais elevados.

Por essa razão, a série é geralmente de maior densidade. O resíduo do processo de refino é um asfalto, e os petróleos nos quais essa série predomina são chamados óleos de base asfáltica. A série aromática, de fórmula geral C_nH_{2n-6} é uma série cíclica não-saturada. Seu membro mais comum é o benzeno (C_6H_6) está presente em todos os óleos crus, mas como uma série os aromáticos geralmente constituem somente uma pequena porcentagem da maioria dos óleos (LEAHY & COLWELL, 1990; SUGIURA et al., 1997; HAFNER et al., 2005; BICEGO et al., 2006; BRITO et al., 2006; LIANG et al., 2007).

2.1.3. O Petróleo no Meio Ambiente

A poluição por petróleo e seus derivados, em ambientes terrestres e aquáticos, têm sido considerada um dos principais problemas ambientais das últimas décadas. Diversas técnicas físicas e químicas foram desenvolvidas para a retirada do petróleo derramado no mar ou para a redução dos seus efeitos sobre os ecossistemas. A descoberta de que certos microrganismos que vivem em sedimentos marinhos, inclusive em areia de praias, podem degradar os componentes do petróleo, abriu a possibilidade de usar métodos biológicos para o tratamento dos derrames (TALLEY, 2002; BARRA et al., 2005; YOUNGWOON SEO et al., 2009).

A capacidade de certos microrganismos de utilizar hidrocarbonetos como fonte única de carbono foi apresentada pela primeira vez por Claude E. ZoBell em 1946. Na época, porém, os derrames de petróleo ainda não eram vistos como um problema ambiental sério. Apenas 21 anos depois, em 1967, o acidente com o petroleiro Torrey Canyon, na Inglaterra, e o desenvolvimento da exploração de petróleo no Ártico, serviram de alerta para o risco de outros acidentes. Diversos estudos foram iniciados, desde então, para verificar o destino e as conseqüências do derrame de petróleo nos ecossistemas (TALLEY, 2002; PRINCE, 2002; KRAUSS et al., 2005; GROSJEAN et al., 2009).

A partir daí, as pesquisas procuravam respostas para diversas perguntas sobre os componentes biodegradáveis do petróleo; os fatores ambientais que influenciariam a degradação dessas substâncias e a distribuição das populações de

microrganismos capazes de degradar o petróleo e seus derivados. Após o acidente com o petroleiro Exxon Valdez, em que o óleo derramado no mar atingiu 15% da costa do golfo do Alasca, e a guerra do Golfo que formou 330 lagos de óleo no Kuwait, os processos de degradação biológica chamados, em conjunto, de biorremediação receberam maior atenção. Tais processos surgiram a partir de estudos de decomposição e detoxificação de pesticidas em solos e, mais tarde, foram propostos como promissores para a recuperação de áreas costeiras atingidas por derrames de petróleo (BALBA et al., 1998; TALLEY, 2002; PRINCE, 2002; KRAUSS et al., 2005; ARODI et al., 2009).

Após a entrada no meio ambiente, o petróleo sofre alterações de suas características originais, devido a fatores físicos como evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica e, principalmente os biológicos, como a biodegradação. As transformações físicas e biológicas são reguladas pelas características específicas do derramamento e do ambiente atingido. Assim, o grau de impacto ambiental e persistência do petróleo no ambiente dependem de fatores como habitat atingido, tipo e quantidade do óleo derramado, espécies de organismos atingidos, época do ano (podem afetar o ciclo de vida das espécies), condições hidrográficas e meteorológicas (pode afetar a dispersão do petróleo), clima, frequência e duração da exposição ao petróleo (PRINCE, 2002; KRAUSS et al., 2005; MEIRE, 2006).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environment Protection Agency), 16 hidrocarbonetos aromáticos são considerados importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários (EPA 1986): Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno (Figura 1). Esses compostos apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos conjugados com peso molecular (*PM*) variando entre 128 e 278 g / mol. Suas características físico-químicas, como solubilidade (*S*) e pressão de vapor (*PV*), são fatores importantes que direcionam a distribuição desses contaminantes entre as fases solúvel e particulada em meio atmosférico, aquoso e biótico. A solubilidade em água dos HPAs varia entre os altamente insolúveis (e.g. benzo[g,h,i]perileno: 0,003

mg / L) a pouco solúveis em água (e.g. aftaleno, 31 mg / L), enquanto a pressão de vapor transita entre compostos altamente voláteis (naftaleno) e compostos relativamente pouco voláteis (dibenzo[a,h]antraceno) (NETTO, 2000; PRINCE, 2002; KRAUSS et al., 2005; XUE & WARSHAWSKY, 2005; MEIRE, 2006) .

Dessa forma, o petróleo e seus derivados têm dado origem a sérios problemas ambientais devido à sua alta toxicidade, persistência, hidrofobicidade e capacidade de bioacumulação. Por essas razões, são considerados pelo Ato Americano - Resource Conservation and Recovery, como resíduos perigosos à saúde humana e ao meio ambiente (KEITH & TELLIARD, 1979; XUE & WARSHAWSKY, 2005).

2.1.4. Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são compostos orgânicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, contendo um ou mais anéis benzênicos, arrançados de forma linear, angular ou em grupos (Figura 1). Devido à fusão desses anéis e das várias posições em que estes podem se ligar é possível a formação de mais de cem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (POTIN et al., 2004; BASANTA et al., 2009).

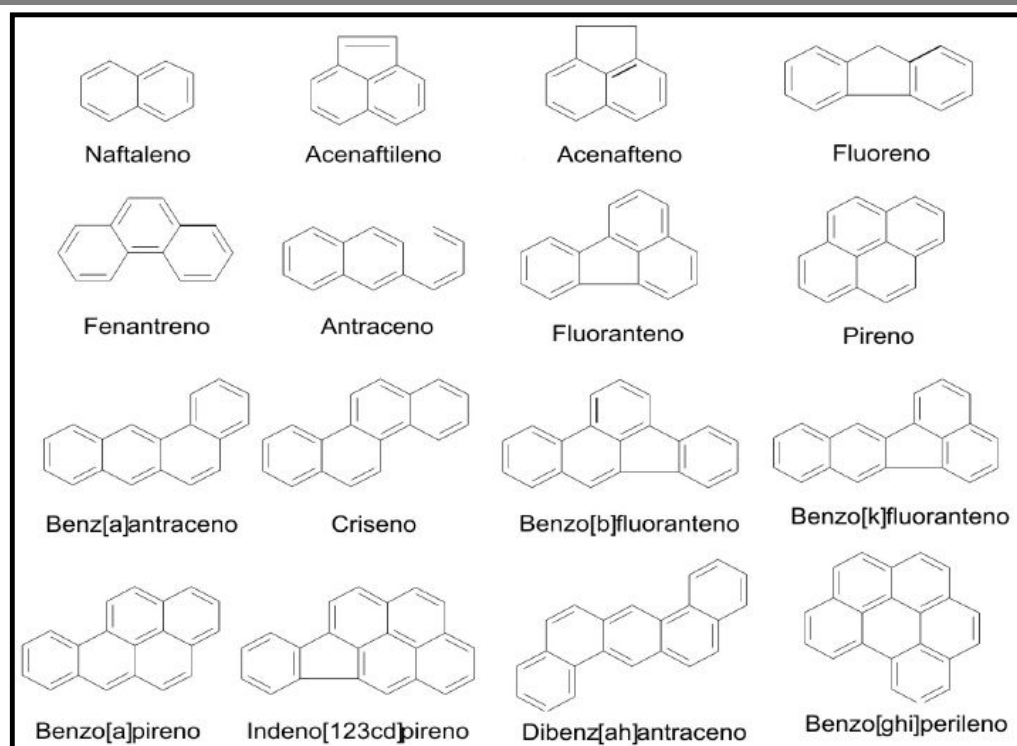


Figura 1. Estrutura de alguns hidrocarbonetos aromáticos causadores de poluição ambiental. Fonte: Cerniglia, 1997.

Esses compostos são produzidos naturalmente ou podem resultar da ação antropogênica, como a queima de combustíveis fósseis (gasolina, querosene, óleo diesel), como também na fabricação de corantes, fibras sintéticas, preservantes de madeira, produção de carvão vegetal, extração e gaseificação do carvão mineral e extração, transporte, refino, transformação e utilização de petróleo e seus derivados (BOSSERT & COMPEAU, 1995; BANFORTH & SINGLETON, 2005; MAGDIEL et al., 2009).

Em geral as emissões de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos no meio ambiente podem ocorrer através de três possíveis fontes: pirolítica, petrogênica e diagênica. Os HPAs de origem pirolítica, resultam da combustão incompleta de matéria orgânica sob condições de elevada temperatura, baixa pressão e curto tempo de formação. Acredita-se que esses HPAs são formados pela “quebra” ou “rompimento” da própria matéria orgânica em moléculas menores durante a pirólise, e consecutivamente rearranjados em HPAs não alquilados. Os HPAs de origem

petrogênica são formados por processos diagênicos, que neste caso, remetem a condições de baixa temperatura, sobre escalas geológicas de tempo. Essas condições influenciam a composição primária de moléculas alquiladas, onde HPAs são derivados principalmente de material vegetal fóssil. Processos diagênicos (qualquer mudança química, física ou biológica sofrida por um sedimento após sua deposição inicial, sob condições relativas de baixa temperatura e pressão) também podem formar HPAs através de precursores biogênicos, como por exemplo, a formação de terpenos, derivados de material vegetal e que potencialmente geram hidrocarbonetos polinucleados como perilenos, retenos e crisenos, assim como em alguns compostos derivados de fenantreno. Porém a principal via de HPAs utilizada no meio ambiente está nas atividades humanas presentes em grandes centros urbanos e complexos industriais. Uma quarta fonte potencial de HPAs, descrita na literatura, está na síntese biogênica desses compostos. (NEFF, 1979; MEYER & ISHIWATARI, 1993; SILIMAN et al., 1998; WILKE & AMELUNG, 2000; PEREIRA et al., 2002, TORRES et al., 2002, GARBAN et al., 2002; KUNLANEE et al., 2009).

Muitas dessas moléculas estão incluídas na lista de poluentes orgânicos prioritários, Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency - EPA), dos Estados Unidos, como resíduos perigosos à saúde humana e ao meio ambiente, por serem considerados carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, além de possuírem efeitos aos seres vivos, apresentando a capacidade de se acumular nas diferentes cadeias tróficas. No Brasil, somente o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos HAPs. Dessa forma, os HAPs vêm sendo estudados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica (KEITH & TELLIARD, 1979; HOLLIGER et al., 1997; CETESB, 2005).

2.2. Aspectos Toxicológicos dos HAPs

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são lipossolúveis na membrana celular, e prontamente assimilados pelo organismo dos seres humanos via inalação, exposição oral e dérmica, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O metabolismo dos HAPs produz compostos epóxidos com elevadas propriedades carcinogênicas e

mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer devido à presença dessas substâncias (CHAKRADEO et al., 1993; NETTO et al., 2000; DOUBEN, 2003; SILKE et al., 2009).

A relação entre altas incidências de câncer e a exposição humana aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, resultou em pesquisas sobre a fonte, a ocorrência, a acumulação, o metabolismo e a remoção desses poluentes dos ecossistemas terrestres e aquáticos (CERNIGLIA, 1997; HAFNER et al., 2005).

No ser humano, uma vez absorvido pelas células, os HAPs são metabolicamente ativados e, desta maneira, tornam-se reativos aos grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares. A biotransformação dos HAPs abrange uma série de reações de oxidação, redução, hidrólise e de conjugação que são realizadas principalmente no fígado por enzimas do sistema das monooxigenases de função mista da super família dos citocromos P450. Este tipo de transformação tem o objetivo de fazer com que determinado metabólito seja mais hidrofílico que o seu precursor, com isso facilitando a excreção dos fluidos biológicos. A indução de monooxigenases por substâncias químicas estranhas ao corpo é estudada em diversos organismos e já foi observada em mamíferos, peixes, insetos, plantas, bactérias e fungos (CONNEY, 1982; KLASSEN et al., 1996).

Na década de 1980 já se sabia que algumas substâncias químicas naturais e sintéticas, com as mais variadas estruturas, eram capazes de aumentar os níveis das enzimas microssomais, quando administradas em animais de laboratório. Drogas como a zoxazolamina, hormônios esteróides, alguns pesticidas e herbicidas, certos corantes e os HAPs são exemplos de indutores de monooxigenases. Sabe-se que o processo de oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diol-epóxidos é considerado um dos mecanismos de ativação mais aceito na literatura para bioativação dos HAPs carcinogênicos. A ativação desses compostos é conduzida pela enzima citocromo P450, especialmente sob duas formas principais: P4501A1 e P4501A2 (HALL et al., 1989; KLASSEN et al., 1996).

Contudo, existem outros mecanismos que também explicam a ativação de HAPs em sistemas biológicos, como por exemplo, a produção de radicais catiônicos, a formação de ésteres benzílicos e a produção de quinonas. Além do que, acredita-se que o efeito da toxicidade do HAPs sobre as moléculas de DNA nas células,

implique em potenciais efeitos mutagênicos. Um desses indícios está na mutação da proteína p53 que é responsável pelo controle da proliferação celular em mamíferos. Por isso, há um interesse crescente de se entender o destino e as formas de desaparecimento de tais compostos, com o intuito de avaliar e monitorar possíveis grupos ocupacionais a exposição de HAPs, para que haja o desenvolvimento de métodos eficientes de remoção dos mesmos do meio ambiente (BINKOVÁ et al., 2000; VALENTINA et al., 2009).

2.3. Biodegradação dos Hidrocarbonetos derivados Petróleo

Embora inúmeros hidrocarbonetos sejam considerados como recalcitrantes, persistentes, no meio ambiente, seu desaparecimento pode ocorrer através de uma variedade de processos abióticos, como a volatilização, lixiviação e a fotodegradação. No entanto, a biodegradação representa a principal rota na qual esses compostos podem ser removidos do meio ambiente. Neste sentido, a biorremediação surge como uma estratégia alternativa na qual organismos vivos são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir, remediar, poluentes do meio ambiente e transformá-los em substâncias inertes (ELLIS et al., 1991; HOLLINGER et al., 1997; HWANG & CUTRIGHT, 2002).

A biorremediação, definida como a transformação e/ou degradação de compostos xenobióticos para torná-los inertes, pode envolver o emprego de microrganismos endógenos e/ou nativos, ou ainda pode utilizar microrganismos exógenos. De um modo geral, a biorremediação requer mecanismos para estimular e manter a atividade microbiana durante o processo. Normalmente, estes mecanismos requerem um ou mais dos seguintes componentes: um aceptor de elétrons (oxigênio, nitrato); nutrientes (nitrogênio, fósforo); e uma fonte de energia (carbono). A biodegradação dos hidrocarbonetos se inicia com a oxidação do substrato por oxidases, em condições aeróbias. Os alcanos são transformados em ácidos carboxílicos, os quais são também metabolizados pelos microrganismos. Os compostos aromáticos são geralmente hidroxilados, formando dióis, os quais são degradados a catecóis, e esses são posteriormente também metabolizados. Como a degradação de hidrocarbonetos para CO₂ envolve reações de oxidação, os

organismos, em sua maioria, são aeróbios. Entretanto, pode ocorrer uma taxa lenta de degradação anaeróbia, como no caso do tolueno e xileno, em condições de redução de sulfato, nitrato e Fe^{3+} (ATLAS & BARTHA, 1992; LATIMER & ZHENG, 2003; LOPERENA et al., 2009).

A biodegradação desses compostos é inversamente proporcional ao número de anéis na molécula benzênica. Assim, a transformação de substâncias, que contém dois anéis benzênicos, como o fenantreno e fluoreno, e contendo três anéis aromáticos, como o antraceno, é relativamente rápida. Por outro lado, microrganismos capazes de utilizar compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como fluoranteno e pireno, já foram isolados e caracterizados (HEITKAMP et al., 1987; LANTZ et al., 1995; QUIROZ et al., 2005).

Tem sido demonstrado que n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicoalcanos são mais facilmente degradados pelos microrganismos, seguidos por aromáticos leves, sendo que os compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como benzo(a)pireno e o criseno, contendo mais de três anéis benzênicos, são mais recalcitrantes ao ataque microbiano e, por isso, persistem por mais tempo no ambiente. Esses compostos surgem no meio ambiente, devido tanto aos processos naturais quanto aos de origem de atividades humanas (SUGIURA et al., 1997; SANTOS et al., 2004).

O conhecimento da capacidade de recuperação de ecossistemas passa pelo estudo das suas características físico-químicas e biológicas, assim como de suas interações com os componentes oriundos de atividades humanas. Muitos microrganismos são capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo. Alguns podem degradar alcanos, outros compostos aromáticos e alguns conseguem metabolizar ambos. Entre os aromáticos, os de baixo peso molecular como o benzeno, tolueno e xileno estão entre os componentes tóxicos do petróleo e são facilmente degradados por microrganismos e com uma taxa de degradação menor, se comparadas com moléculas de estruturas mais simples, como os alcanos (ATLAS, 1995; VENTURINI & TOMMASI, 2004; MARTÍNKOVA et al., 2009).

Os efeitos tóxicos agudos do petróleo tendem a ser causados por moléculas de baixo peso molecular, que se degradam mais rapidamente. Por outro lado, os efeitos crônicos da poluição, com petróleo ainda são pouco conhecidos. Contudo,

supõe-se que tais efeitos se devem aos constituintes de alto peso molecular, geralmente os aromáticos, que apresentam menor toxicidade, mas recalcitrantes, causando efeitos mais duradouros. Assim, a degradação dos HAPs por fungos demonstra um importante papel em termos toxicológicos e ambientais, devido a capacidade destes em formar conjugados glicuronídios, glicosídeos e sulfatos a partir de HAPs, essenciais no processo de detoxificação e na eliminação dos compostos aromáticos (VENTURINI & TOMMASI, 2004; SANTOS et al., 2004; QUIROZ et al., 2005).

2.4. Microrganismos Degradores de HAPs

Entre os microrganismos, os fungos têm sido citados por apresentarem a capacidade de oxidar e degradar vários compostos aromáticos. Para que um microrganismo utilize estes compostos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, torna-se necessário que expresse enzimas que transformem as complexas moléculas dos HAPs em compostos intermediários comuns das suas rotas metabólicas (DIETRICH et al., 1995; BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos ligninolíticos e não ligninolíticos. As duas principais vias descritas na literatura relacionadas aos fungos são para os não ligninolíticos e os ligninolíticos. Entre os fungos não ligninolíticos o metabolismo dos HAPs por *Cunninghamella elegans* vem sendo bastante estudado. Este organismo utiliza o sistema enzimático citocromo P-450 monoxigenase para incorporar um átomo de oxigênio no núcleo aromático e reduzir o átomo restante em água. O óxido de areno formado, como produto da reação, é hidrolisado pela enzima epóxido hidrolase produzindo trans-diidrodióis, ou um dos anéis pode ser convertido não enzimaticamente em fenol e se conjugar ao sulfato, ácido glicurônico ou glicose (CERNIGLIA, 1997). (Figura 2)

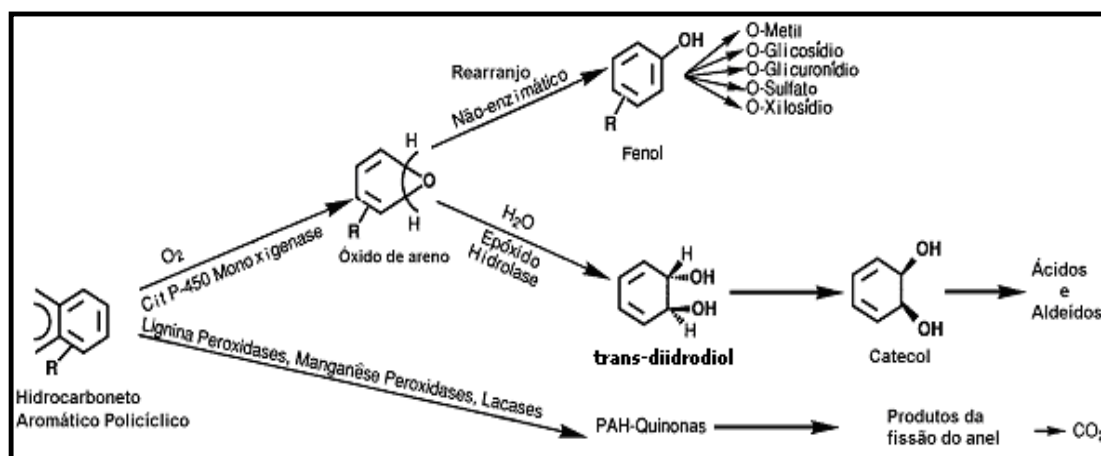


Figura 2. Vias catabólicas para utilização de hidrocarbonetos aromáticos por fungos não ligninolíticos e fungos ligninolíticos. Fonte: Cerniglia, 1997.

Por outro lado, os fungos ligninolíticos, como por exemplo, *Phanerochaete*, demonstra habilidade para oxidar compostos que apresentam estrutura química semelhante às estruturas de moléculas naturais, como a lignina, rica em anéis benzênicos. Estes fungos oxidam seus substratos pela ação das enzimas do complexo ligninolítico, as lacases, a lignina peroxidase e a manganês peroxidase (CERNIGLIA, 1997).

2.5. O Gênero *Rhodotorula*

O microrganismo selecionado para estudo pertence ao gênero *Rhodotorula*, Filo Basidiomycota, Classe Urediniomycetes, Ordem Sporidiales, Família Sporidiobolaceae e foi descrito por Harrison em 1927. Está essencialmente caracterizado por aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Morfologicamente apresentam blastoconídios unicelulares ovóides ou alongados. A formação de pseudo-hifas é normalmente ausente ou rudimentar, contudo, algumas espécies podem formar pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. A reprodução ocorre por brotamento multilateral. Muitas espécies exibem colônias com aspecto mucóide devido à formação da cápsula, enquanto outras são pastosas ou secas e rugosas.

As espécies do gênero sintetizam pigmentos carotenóides em ágar extrato de malte. Não assimilam inositol como única fonte de carbono e hidrolisam a uréia. Não apresentam capacidade fermentativa (LACAZ, 1984; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Espécies do gênero *Rhodotorula* utilizam compostos xenobióticos que normalmente não se encontram em um ambiente natural e são geralmente tóxicos como n-alcanos e n-parafinas e, inclusive, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: tolueno, benzeno, difenilos aromáticos como fonte de carbono (ROMERO et al., 1998; POINTING, 2001).

Estudos de degradação de fenantreno em sedimento, por exemplo, demonstram que *Rhodotorula minuta* e *Candida lipolytica* são capazes de transformar esse hidrocarboneto nos mesmos metabólitos que são produzidos pelos fungos filamentosos. Por outro lado, *Rhodotorula glutinis* é capaz de mineralizar o hidrocarboneto fenantreno, utilizando-o como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, produzindo metabólitos que indicam a degradação do hidrocarboneto (ROMERO et al., 1998).

Em diferentes estudos, leveduras e fungos filamentosos apresentaram a capacidade de utilizar o petróleo e seus derivados para o seu crescimento, sendo isolados e identificados de áreas impactadas. Têm-se isolado e identificado de solos contaminados por petróleo fungos como *Rhodotorula* sp., *Candida* sp., *Torulopsis* sp e *Sporobolomyces* sp e, *Beauveria bassiana*, *Chrysosporium* sp., *Mortierella* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* spp., *Phoma* sp., *Scolecobasidium obovatum*, *Tolypocladium inflatum*, *Trichoderma viride* e *Verticillium* spp. Assim sendo, os fungos são organismos com extrema versatilidade de respostas adaptativas, quando submetido a diferentes condições ambientais, e exibem grande potencial em inúmeros processos biotecnológicos. Paralelamente, por serem organismos eucarióticos, os fungos representam modelos de estudo em diferentes áreas da biologia celular, genética, fisiologia e bioquímica (CHAÎNEAU et al., 1999).

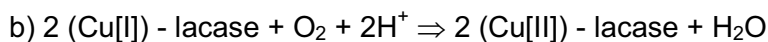
2.6. Enzimas Ligninolíticas: A Lacase e a Manganês Peroxidase (MnP)

Na cadeia alimentar, os fungos ocupam a posição de decompositores, tendo, portanto, um papel muito importante na manutenção do equilíbrio ambiental. Esses

organismos são capazes de produzir enzimas que os tornam aptos a utilizar como fonte de carbono e energia uma ampla gama de substratos com massas molares distintas. As enzimas do complexo ligninolítico, por exemplo, são capazes de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos e estão diretamente envolvidas na degradação de compostos xenobióticos com estrutura química semelhante à molécula de lignina. Contudo, a eficiência desse processo está, diretamente, relacionada à capacidade do fungo em degradar essas substâncias recalcitrantes, transformando-as em substâncias inertes. Dessa forma, essas enzimas vêm sendo estudadas em função da sua potencialidade nos processos de degradação e biotransformação (SREBOTNIK & MESSNER, 1996; POINTING, 2001).

Entre essas enzimas, pode-se citar, as lacases que são fenoloxidasas produzidas por fungos como também por plantas. Pertencem ao grupo das oxidasas que complexam com cobre (metaloproteínas), sendo produzida pela maioria dos Basidiomicetos. O número de isoenzimas da lacase pode ser superior a cinco, dependendo da espécie do fungo e das condições ambientais de crescimento. São consideradas verdadeiras fenoloxidasas e oxidam estruturas fenólicas pela remoção de elétrons mediada pela redução de Cu^{2+} à Cu^{1+} , com formação de radicais, que podem repolimerizar ou despolimerizar. As massas molares estão dentro da faixa de 60-100 kDa. (HIGUCHI, 1989; HOFRICHTER, 2002).

Normalmente, as lacases catalisam reações de oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilos:



Os radicais formados, rapidamente, atuam em reações não catalíticas como no acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Logo, essas reações múltiplas levam à polimerização; a quebras alquil-arílicas; à oxidações nos C_α e desmetilizações.

A Manganês Peroxidase (MnP) constitui o segundo grupo de glicoproteínas que requer íons de manganês livres para a sua atividade. A atuação desta enzima requer a presença de peróxido de hidrogênio. Essa enzima é muito semelhante à lignina peroxidase (LiP), é extracelular, glicosilada, apresenta massa molar de 45-

47kDa e possui um grupo prostético heme. Entretanto, essa enzima é dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{2+} ; α -cetoácidos, como lactato, estabilizam sua atividade oxidativa. O ciclo catalítico da MnP pode ser representado da seguinte forma:

- a) $MnP(Fe[III])P + H_2O_2 \Rightarrow MnP-I(Fe[IV=O])P + H_2O$
- b) $MnP-I(Fe[IV=O])P + Mn^{2+} \Rightarrow MnP-II(Fe[IV=O])P + Mn^{3+}$
- c) $MnP-II(Fe[IV=O])P + AH \Rightarrow MnP-II(Fe[IV=O])P + A + H^+$
- d) $MnP-II(Fe[IV=O])P + Mn^{2+} \Rightarrow MnP(Fe[III])P + Mn^{3+} + H_2O$
- e) $Mn^{3+} + AH \Rightarrow Mn^{2+} + A + H^+$

Na presença de peróxido de hidrogênio MnP / Mn^{2+} / malonato, catalisa quebras $C_\alpha-C_\beta$, oxidações C_α e quebras de ligações aril-alquílicas de fenóis siringílicos diméricos β -1 e β -O-4. Os fungos secretam várias isoenzimas de manganês peroxidase (MnP) para o meio de cultura, embora algumas também possam estar ligadas à parede celular. A literatura relata que alguns fungos apresentam os dois tipos de enzimas. Assim, as enzimas lacase e manganês peroxidase (MnP) apresentam um grande potencial na biotransformação de xenobióticos e de seus derivados. Essas enzimas apresentam um importante papel na descontaminação de áreas contaminadas com HAPs (HIGUCHI, 1989; TUOR et al., 1995; HOFRICHTER, 2002).

2.7. Morfologia e Ultraestrutura

A identificação dos mecanismos e habilidades de crescimento, bem como a atividade enzimática e o comportamento ultraestrutural em microrganismos, representam estratégias de investigação de processos metabólicos. Os efeitos dos parâmetros ambientais, a elucidação das vias metabólicas e suas bases genéticas na degradação dos hidrocarbonetos por microrganismos, assim como os efeitos da contaminação por essas substâncias em ecossistemas têm se constituído em áreas de grande interesse. Dessa forma, a confirmação do potencial biotecnológico dos microrganismos com a análise das condições ambientais de cultivo pode gerar dados fisiológicos, bioquímicos e morfológicos que impliquem em uma possível otimização

das condições e que favoreça a exploração das habilidades do isolado de *Rhodotorula sp* obtido a partir de ambiente contaminado.

As células fúngicas são constituídas pelos principais componentes encontrados nos demais organismos eucarióticos. Quando se examina uma célula de um organismo unicelular ou pluricelular, facilmente se reconhece a entidade celular. As leveduras caracterizam-se morfologicamente por uma grande variação de forma e tamanho celulares, podendo ser ovais, oblongas, ou redondas, geralmente exibindo entre 2 e 7 micrometros de diâmetro, com reprodução sexuada ou assexuada. As colônias apresentam-se glabras, cremosas, ou membranosas, e são observadas, geralmente, após cultivo de 24 a 36 horas, exibindo um crescimento ótimo na faixa de 25°C - 37°C, com tendência a escurecer após alguns dias de cultivo (LACAZ, 1984; BURNETT et al., 1990).

Os métodos citológicos de estudos, de um modo geral, são os mesmos descritos para quaisquer tipos celulares. A citologia estudada através da microscopia óptica convencional dá uma visão geral da forma, tamanho e arranjo das células. Contudo, pensar em morfologia e morfogênese significa avaliar mudanças significativas que ocorrem de forma integrada nos diferentes componentes celulares. Sem sombra de dúvida, a pesquisa ultraestrutural adicionou uma nova dimensão ao estudo das leveduras e fungos filamentosos (KLOPARENS, 1990; SAMSONOFF et al., 1991).

Desde as primeiras pesquisas ultraestruturais, os micologistas têm acompanhado o desenvolvimento das diversas metodologias em todas as áreas da microscopia eletrônica e as têm usado como instrumentos geradores de informações sobre a estrutura de fungos. Deve-se ressaltar que os fungos estavam entre os primeiros microrganismos observados pelo microscópio eletrônico (KLOPARENS, 1990).

Do ponto de vista ultraestrutural, as leveduras como organismos eucarióticos exibem todas as organelas comumente relatadas para o grupo. O núcleo encontra-se delimitado por um envelope, contínuo com o retículo endoplasmático. Poros são comumente observados através da microscopia eletrônica, o qual também mostra o nucleoplasma homogêneo e região nucleolar densa. Quando a célula fúngica sofre mitose, o envelope nuclear não se dissocia e se refaz prontamente. Ao invés disso, o

envelope sofre uma constrição próxima do ponto de separação entre núcleo da célula filha e o núcleo da célula parental. São observados fuso mitótico e centríolos. O núcleo, pois, constitui-se uma área de grande interesse a nível ultraestrutural considerando-se esse peculiar comportamento do núcleo da célula fúngica (ALDRICH & PENDLAND, 1981).

Baseando-se em evidências bioquímicas e fisiológicas, a mitocôndria nas leveduras exibe ultraestruturalmente semelhança àquelas das células vegetal e animal. Contudo, a morfologia e a população dessa organela nas leveduras varia de acordo com o estágio do ciclo celular e condições de cultivo. As mudanças são expressas no arranjo, forma, número de cristas, bem como, no tamanho e forma da organela (BRACKER, 1967; BECKETT, 1974).

O retículo endoplasmático, por sua vez, constitui-se um componente pleiomórfico. Forma e abundância relacionam-se mais aos estímulos ambientais, fase do desenvolvimento e estado fisiológico do que a filogenia. Apresenta-se mais abundante em células jovens e em crescimento ativo. Além disso, a membrana do retículo é estruturalmente diferente da membrana plasmática no que diz respeito à simetria e espessura. Formas porosas, fenestradas, tubulares e vesiculares são encontradas. Nesses organismos, retículo endoplasmático é também dividido em liso e rugoso, os quais estão envolvidos na síntese de lipídios e proteínas, respectivamente. O Complexo de Golgi consiste de cisternas e está associado à secreção (BECKETT et al., 1974).

Os Lomassomos são estruturas formadas de agregados de membranas na matriz entre a membrana plasmática e a parede celular, e por isso são também chamados de corpos periféricos. Evidências sugerem como suas funções secreção, síntese de glicogênio, proliferação da membrana e respostas ao estresse (HEALTH & GREENWOOD, 1970).

Vesículas e vacúolos são também encontradas nas células fúngicas. Nas leveduras ocorre um único e central vacúolo que aumenta de tamanho a medida em que a célula envelhece. Várias vesículas citoplasmáticas são observadas, estando possivelmente associadas à secreção, armazenamento e estocagem de enzimas. Corpos de inclusão são também observados nas leveduras. Inclusões de lipídios são encontradas em células maduras, nas quais constituem-se reservatórios de materiais

ricos em energia e são fontes potenciais de compostos de carbono. Grânulos de glicogênio são comuns como elementos de estocagem, sendo identificados citoquimicamente ou morfolologicamente (BRACKER, 1967; BECKET, 1974).

A membrana plasmática está localizada abaixo da parede celular e exibe duas camadas densas separadas por uma camada intermediária de menor densidade. Nas leveduras, a membrana citoplasmática, forma invaginações que correspondem a porções especializadas da membrana. Em células com crescimento logarítmico, as invaginações mostram-se curtas. Por outro lado, em fase estacionária exibem invaginações longas e profundas. A densidade das invaginações varia, também, de acordo com a fase de crescimento do microrganismo. A membrana das leveduras exibe fosfolipídios, proteínas e esteróis, principalmente o ergosterol. Além do que, realiza funções distintas como definir e conter a célula, selecionar e controlar o movimento de substâncias, detectar e produzir respostas, além de corresponder a sítios para atividades específicas e presença de moléculas situadas ou embebidas na membrana (TAKEO et al., 1993; GRIFFIN, 1994).

As leveduras à semelhança das células vegetais e bactérias possuem parede celular que consiste basicamente de polissacarídeos, lipídios e proteínas. Fisicamente constitui-se de microfibrilas cimentadas por uma matriz amorfa. A quitina é o principal elemento esquelético ou microfibrilar. Proteínas e polissacarídeos como glucanas, mananas, galactanos e heteropolissacarídeos correspondem às substâncias cimentantes que ligam os diferentes componentes estruturais (GRIFFIN, 1994).

A composição química das paredes celulares é fortemente influenciada por condições ambientais e fisiológicas, por exemplo, nos casos onde ocorre dimorfismo, a temperatura pode influenciar a mudança de forma, que acarreta automaticamente à mudança na composição dos polissacarídeos da parede celular (AMER & TAHA, 1993).

Estudos degradativos demonstram que paredes celulares em fase logarítmica de crescimento diferem nos tipos de polissacarídeos presentes em relação às células em fase estacionária de crescimento. De um modo geral, a arquitetura da parede celular muda quando os nutrientes, a temperatura, a tensão de oxigênio, entre outros fatores, são alterados. A determinação da arquitetura das paredes celulares das

leveduras resultou de estudos bioquímicos e enzimáticos, precedidos de exames ao microscópio eletrônico (CAMPOS TAKAKI, 1989; DEBONO & GORDIER, 1994).

A aplicação da microscopia eletrônica na área da micologia, com o uso de protocolos e técnicas de fixação e contraste, e a introdução de técnicas citoquímicas, permitiu a ampliação dos conhecimentos sobre a estrutura de parede celular nas leveduras de um modo geral. A citoquímica permitiu conseqüentemente a análise, localização e a determinação da arquitetura das paredes, com a intenção de relacionar estrutura e função celulares (AKASHI et al., 1993).

Dessa forma, a introdução de protocolos experimentais sobre aspectos ultraestruturais representa uma nova dimensão para o estudo da organização celular e, conseqüentemente, introduz novas perspectivas para uma avaliação mais precisa dos aspectos fisiológicos, bioquímicos e taxonômicos de fungos.

3. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, R.R.; TANG, J.X.; ALEXANDER, M. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **J. Environ. Qual.** v.31, p. 150-154, 2002.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. Introduction to Mycology. John Willey & Sons, New York, 869p, 1996.

AKASHI, T.; HOMMA,.; KANBE, T.; TANAKA, K. Ultrastructure of proteinase secreting cels of *Candida albicans* studied by alkaline bismuth staining and immunocytochemistry, **J. Gen. Microbiol**, v.139, p. 2185-2195, 1993.

ALDRICH, H.C. & PENDLAND, J.C. Nuclear pores during the cell cycle in a slime mold, *Physarium polycephalum*. **Tissue Cell**, v.13, p. 431-439, 1981.

AMER, M.A. & TAHA, M. Ultrastucture of *Trichophyton violaceum*. **Int. J. Dermatol**, v.32, p. 97-99, 1993.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Abundance, distribution an oil biodegradation of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. **Biotechnology & Bioengineering**, v.14, p. 309-317, 1992.

BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal Microbiological Methods**, v.32, p. 155, 1998.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, pp. 723-736, 2005.

BARRA, R.; POPP, P.; QUIROZ, R.; BAUER, C.; CID, H. & TUMPLING, W.V. Persistent toxic substances in soils and waters along an altitudinal gradient in the Laja river basin, central southern Chile. **Chemosphere**, v.58, p. 905-915, 2005.

BECKETT, A.; HEATH, I.B.; MCLAUGHLIN, D.J. An atlas of fungal Ultrastructure. Longman Group Limited, 221p, 1974.

BICEGO, C.M.; et al. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.52, n.12, p. 1804-1816, 2006.

BINKOVÁ, B.; GIGUÈRE, Y.; RÖSSNER-JR, P. DOSTÁL, M. & SRÁM. R. 2000. The effect of dibenzo[a,h]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.47, n.(1-2), p. 57-70, 2000.

BOSSERT, I.D.; COMPEAU, G.C. Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil. In: YOUNG, L.Y.; CERNIGLIA, C.E. (Eds.). **Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals**, Wiley Liss, New York, p. 77-125, 1995.

BRACKER, C.E. Ultrastructure of fungi. **Ann. Rev. Phytopathol**, v.5, p. 343-374, 1967.

BRITO, E.M.S. et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v.15, n.8, p. 752-762, 2006.

BURNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeasts: Characteristics and Identification. 2nd Edition. Cambridge University Press. Inglaterra, 683p, 1990.

CAMPOS TAKAKI, G.M.; DIETRICH, S.M.C.; MANOCHA, M.S. The influence of culture age on the chemical of cell wall of *Elysomyces anomalus*. **Rev. Microbiol**, v.20, p. 321-326, 1989.

CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampsfire, v.19, n.5-6, p. 324-333, 1997.

CETESB. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Online: Disponível na Internet http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp. 2005.

CHAÎNEU, C.H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **The Science of the Total Environmental**, v.277, p. 237-247, 1999.

CHAKRADEO, P.P. et al. Effect of benzo(a)pyrene and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amserdam, v.17, n.7, p. 671-676, 1993.

CONNEY, A.H. Introduction of microsomeal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes memorial lecture. **Cancer Research**, v.42, p. 4875-4917, 1982.

DEBONO, M. & GORDIER, R.S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. **Ann. Eview. Microbiol**, v.48, p. 471-497, 1994.

DIETRICH, D.; HICKEY, W.J.; LAMAR, R. Degradation of 4,4-dichlorobiphenyl, 3,3,4,4-tetrachlorobiphenyl, and 2,2,4,4,5,5-hexachlorobiphenyl by the white rot

fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p. 3904-3909, 1995.

DOUBEN, P.E.T. PAHs: An Ecotoxicological perspective (first edition). John Wiley & Sons, Ltda. England. ISBN 0-471-56024-3. Pp 389. 2003.

ELLIS, B.; HAROLD, P.; KRONBERG, H. Bioremediation of creosote contaminated site. **Environmental Technology**, v.12, p. 447-459, 1991.

FU, Y.; VIARRAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Technology**, v.79, p. 251-262, 2001.

GARBAN, B.; BLANCHOU, H.; MOTALAY-MASSEI, A.; CHEVREUIL, M. & OLLIVON, D. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment*, v.36, p. 5395-5403, 2002.

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

HAFNER, W.D.; CARLSON, D.L & R.A. HITES. Influence of local human population on atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations. **Environmental Science & Technology**, v.39, n.19, p. 7374-7379, 2005.

HEALTH, I.B. & GREENWOOD, A.D. The structure and formation of Lomasomes. **J. Gen. Microbiol**, v.62, p. 129-136, 1970.

HEITKAMP, M.A.; FREEMAN, J.P.; CERNIGLIA, C.E. Naphtalene biodegradation in environmental microcosms: Estimates of degradation rates and characterization of metabolites. **Applied and Environmental**, v.53, p.129-136, 1987.

HIGUCHI, T. Mechanisms of lignin degradation by peroxidase and laccase of White rot fungi. In.: LEWIS, N.G.; PAICE, M.G. (Ed.). **Biogenesis and biodegradation of**

plant cell polymers. Washington: American Chemical Society, (ACS Symposium Series, 399), p. 482-502, 1989.

HOFRICHTER, M.; Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p. 454-466, 2002.

HOLLIGER, C. et al. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p. 517-523, 1997.

HWANG, S. & CUTRIGHT, T.J. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere*, v.47, p. 891-899, 2002.

JACQUES, R.J.S. et al. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremedition Journal**, Philadelphia, v.11, n.1, p. 1-11, 2007.

JOHNSEN, A.R. et al. Principles of microbial PAH degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p. 71-84, 2005.

KEITH, L.H.; TELLIARD, W.A. Priority Pollutants I: A perspective view. **Envirenmental Science and Technology**, v.13, p. 416-423, 1979.

KLAASSEN, C.D.; DOULL, J. & AMDUR, M.O. Casarett and Doull's Toxicology – the basic science of poisons. (5th Edition). McGraw-Hill. New York. ISBN0-07-105476-6. 1996.

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

KRALLISH, I. et al. Phenol degradation by immobilized cold adapted yeast strains of *Cryptococcus terreus* and *Rhodotorula crestinivora*. **Extremophiles**, v.10, p. 441-449, 2006.

KRAUSS, M.; WILKE, W.; CHRISTOPHER, M.; ADELMAR, G.B.; MARCOS, V.B.G. & WULF, A. Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tropical rain forest environmental. **Environmental Pollution**, v.135, p. 143-154, 2005.

LACAZ, C.S. Micologia Médica. Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico. 7ª Edição. Ed. Sarvier São Paulo, 470p, 1984.

LANTZ, S.; LIN, J.E.; MUELLER, J.G.; PRITCHARD, P.H. Effects of surfactants on fluoranthene mineralization by *Sphingomonas paucimobilis* Strain EPA 505. In: HINCHEE, R.E.; BROCMAN, F.J.; VOGEL, C.M. (Eds.). **Microbial Process for Bioremediation**. Columbus: Battelle Press, p. 7-14, 1995.

LATIMER, J.S. & ZHENG, J. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: PAHs: An ecotoxicological perspective. *John Wiley & Sons, Ltd.* ISBN: 0-471-56024-3. p. 9-33, 2003.

LEAHY, J.G. COLWELL, R.R. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environmental. **Microbiological Review**, v.54, p. 305-315, 1990.

LI, Z.; YUAN, H. Characterization of cadmium removal by *Rhodotorula* sp Y11. **Applied Microbial Biotechnol**, v.73, p. 458-463, 2006.

LIANG, Y.; SORENSEN, L.D.; MCLEAN, E.J. Humic acid effect on pyrene degradation: finding of an optimal range for pyrene solubility and mineralization enhancement. **Appl. Microbiol. Biotchol.**, v.37, p. 1368-1375, 2007.

LIANG, Y.; SORENSEN, L.D.; MCLEAN, E.J. Pyrene fate affected by humic acid in soil slurry systems. **Journal of Biological Engineering**, p. 2-11, 2008.

MEIRE, R.O. Avaliação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em áreas de proteção permanente - sudeste brasileiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pp. 53, 2006.

MEYER, P.A. & ISHIWATARI, R. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry*, v.20, p. 867-900, 1993.

NETTO, A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives: a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p. 765-773, 2000.

NEFF, J.M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment Sources, fate, and biological effects. Applied Science Publishers, London. 1979.

PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. & MIGUEL, A.H. Measurements of semivolatile and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in a bus station and an urban tunnel in Salvador, Brazil. *Journal of Environmental Monitoring*, v.4, p. 558-561, 2002.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, p. 20-23, 2001.

POTIN, O et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

PRINCE, R.C. Petroleum and other hydrocarbons. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (C. BITTON, G., Ed.). John Wiley, New York, p. 2402-2416, 2002.

QUIROZ, R.; POPP, P.; URRUTIA, R.; BAUTER, C.; ARANEDA, A.; TREUTLER, H.C. & BARRA, R. PAH fluxes in the Laja lake os south central Chile Andes over the last 50 years: Evidence from a dated sediment core. *Science of the Total Environment*, v.349, n.1-3, p. 150-160, 2005.

REYNOLDS, C.M.; SKIPPER, H.D. Bioremediation of contaminated soils. In: Principles and applications of soil microbiology. (D.M. SYLVIA, P.G. HAARTEL, J.J. FURHMAN and D.A. ZUBERER, Eds.) 2nd edition. Pearson-Pretice Hall Upper Saddle, New Jersey, p. 536-561, 2005.

ROMERO, M.C.; CAZAU, M.C.; GIORGIERI, S.; ARAMBARRI, A.M. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. **Environmental Pollution**, v.101, p. 355-359, 1998.

SAMSONOFF, W.A.; SALAZAR, M.E.; MCKEE, M.L. Scanning Electron Microscopy of the Conidia Produced by the Mycelial form of *Paracoccidioides brasilienses*. **Mycopathologia**, v.114, p. 9-15, 1991.

SANTOS, C.Y.M.; AZEVEDO, D.A.A. & NETO, F.R.A. Atmospheric distribution of organic compounds from urban areas near a coal-fired power station. *Atmospheric Environment*, v.38, p. 1247-1257, 2004.

SILLIMAN J.E.; MEYERS P.A. & EADIE, B.J. Perylene: an indicator of alteration processes precursor materials? *Organic Geochemistry*, v.29, p. 1737-1744, 1998.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. Biotechnology in the pulp and paper industry. Recent advances in applied and fundamental research, Facultas Universitätsverlag, Viena, Austria, pp. 661, 1996.

SUGIURA, K.M.; ISHIHARA, T.; SHIMAUCHI, Y.S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science Techonology*, v.31, p. 45-51, 1997.

TALLEY, J.W.; GHOSH, U.; TUCKER, S.G.; FUREY, J.S. & LUTHY, R.G. Particule scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment. *Environmental Science Technology*, v.36, p. 447-483, 2002.

TAKEO, K.; MINE, H.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. The existence of a dispensable fibrillar layer on the wll surface of mycelial but not yeast cells of *Aureobasidium pullulans*. **FEMS Microbiol. Lett**, v.111, p. 153-158, 1993.

THE UNIVERSITY OF MINNESOTA. Biocatalysis / Biodegradation Database: Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways primarilyfor xenobiotic, chemical compounds. Online. Disponível na Internet http://umbbdd.ahc.umn.edu/pha2/pha2_image_map.html. 2005.

TISSOT, B.P.; WELTE, D.H. Petroleum formation and ocurrence. Berlim: Springer Verlag, 539p, 1978.

TORRES, J.P.M.; MALM, O.; VIEIRA, E.D.R.; JAPENGA, J. & KOOPMANS, G.F. Organic micropollutants on river sediments from Rio de Janeiro, Southeast Brazil, *Caderno de Saúde Pública*, v.18, n.2, p. 477-488, 2002.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v.41, p. 1-17, 1995.

VENTURINI, N. & TOMMASI, L.R. Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.48, p. 97-107, 2004.

XUE, W. & WARSHAWSKY, D. Metabolic activatio of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.206, p. 73-93, 2005.

WILCKE, W. & AMELUNG, W. Persistent organic pollutants in native grassland soils along a climosequence in North America. Soil Science Society of America Journal, v.64, p. 2140-2148, 2000.

Primeiro Artigo:

EFEITO DO PIRENO SOBRE O CRESCIMENTO DE *Rhodotorula mucilaginosa*

Proceedings Book titled: Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, distributed by World Scientific Publishing Co, 2009.

EFEITO DO PIRENO SOBRE O CRESCIMENTO DE *Rhodotorula* *mucilaginosa*

Petrusk Homero Campos Marinho^{a,b}, Patrícia Mendes de Souza^{a,c}, Marcos Antônio Barbosa de Lima^{a,d}, Aline Elesbão do Nascimento^a, Galba Maria de Campos Takaki^{a,b,c}

^aNúcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^bPrograma de Pós - Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^cPrograma de Pós Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^dDepartamento de Biologia - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author. Tel: +55-81-21194017; Fax: +55-81-21194043

E-mail address: gmctakaki@pesquisador.cnpq.br (Campos-Takaki, G.M.)

RESUMO

Entre as leveduras, espécies do gênero *Rhodotorula* apresentam a capacidade de utilizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) como única fonte de carbono e energia. O presente estudo teve como objetivo analisar o efeito das diferentes concentrações de pireno, 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL sobre o crescimento celular de *Rhodotorula mucilaginosa* nos meios de cultura Yeast Mold Agar (YMA) e Yeast Mold Broth (YMB). Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas na viabilidade celular, velocidade específica de crescimento ($\mu_{esp.}$) e tempo de geração (T_g) de acordo com as concentrações testadas e os intervalos de tempo de crescimento. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho foi possível inferir que o efeito inibitório do pireno reflete o estado fisiológico de estresse celular ao qual a levedura foi submetida, devido à presença do xenobiótico no meio de cultura.

Palavras-Chave: Viabilidade Celular, Pireno, *Rhodotorula*

ABSTRACT

Among the yeasts, species of the genus *Rhodotorula* can use polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as the sole carbon and energy source. The present study was carried out in order to evaluate the effects of different pyrene concentrations, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL and 1mg/mL on the growth of *Rhodotorula mucilaginosa* grown in Yeast Mold Agar (YMA) and Yeast Mold Broth (YMB) media. Significant differences had been observed in the cellular viability, maximum growth rate ($\mu_{\text{esp.}}$) and generation time (Tg) according to the concentrations used and to the intervals of growth time. According to the results obtained in this work it is possible to suggest that the inhibitory effect of the pyrene reflects the physiological state related to the cellular stress in presence of the xenobiotic in the culture medium.

Keywords: Cellular Viability, Pyrene, *Rhodotorula*

1. INTRODUÇÃO

A relação entre as leveduras e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) é relativamente bem documentada. Contudo, poucas informações sobre a resistência / tolerância desses microrganismos frente à presença de pireno têm sido publicadas. O estudo das interações entre as leveduras e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são extremamente relevantes sob os pontos de vista científico e tecnológico. Entre os fungos, as leveduras são os microrganismos mais explorados cientificamente, por apresentarem mecanismos bioquímicos e fisiológicos comuns a todos os organismos eucarióticos, para o estudo de fenômenos celulares básicos, e assim servir de excelente modelo para a elucidação de muitos problemas importantes na biologia dos eucariotos (BROCK et al., 1994; JUAREZ-RAMIREZ et al., 2001).

O pireno é um dos mais abundantes hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) encontrados no meio ambiente. É um xenobiótico ubíquo e extremamente persistente que apresenta efeito tóxico além de propriedade mutagênica e carcinogênica (BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

As leveduras predominam entre os fungos encontrados em ecossistemas poluídos. Algumas espécies dos vários gêneros de leveduras exibem a habilidade de degradar e metabolizar estas substâncias recalcitrantes, como fonte única de carbono e energia. Contudo, altas concentrações podem inibir o crescimento microbiano. Espécies do gênero *Rhodotorula* são capazes de crescer, por exemplo, em meio líquido contendo aromáticos, com ou sem co-substratos, podendo transformar o hidrocarboneto presente no meio (RUIZ-ORDAZ et al., 1998; JUAREZ-RAMIREZ, 2001).

As leveduras se encontram na natureza em ampla variedade de substratos e ambientes. Sabe-se que estes microrganismos exibem grande flexibilidade em suas adaptações às mais diferentes condições ambientais. Este ajustamento resulta certamente de fatores genéticos, bioquímicos e fisiológicos. Por outro lado, conhece-se o fato de que condições ambientais adversas podem influenciar o comportamento de muitos microrganismos, de forma positiva ou negativa (BERGAUER et al., 2005)

Assim sendo, estudos sobre a relação entre um microrganismo em particular e seu ambiente são fundamentais para a caracterização e determinação de sua versatilidade metabólica às diferentes condições de estresse e à sua resposta adaptativa. Por outro lado, também, determina as características observadas em relação ao potencial deste organismo. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do pireno nos diferentes estágios de crescimento da levedura *Rhodotorula sp*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Foi utilizada *Rhodotorula mcilaginosa* UCP 1003, gentilmente cedida pelo Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - NPCIAMB - da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife - PE, Brasil; cadastrada no WFCC (*World Federation Culture Collection*). O microrganismo foi mantido no meio Yeast Mold Agar (YMA), sob refrigeração, à temperatura de 4°C. Paralelamente, repiques sucessivos foram realizados a cada 30 dias para manter a viabilidade.

2.2. Substrato

O Hidrocarboneto Aromático Policíclico (HAP) utilizado neste experimento foi o Pireno (SIGMA). O hidrocarboneto foi solubilizado em acetona 70%.

2.3. Meios de Cultura

2.3.1. Meio de Manutenção

Para manutenção foi utilizado o meio Yeast Mold Agar (YMA) descrito por CIRIGLIANO & CARMAN (1983), constituído dos seguintes nutrientes: Extrato de Levedura - 0,3 %; Extrato de Malte - 0,3 %; Peptona 0,5 %; D - Glicose - 1,0 % e Agar - 1,5 %. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com uma solução de NaOH 1M ou HCl 1M.

2.3.2. Meio de Crescimento

Foi utilizado o meio Yeast Mold Broth (YMB), também descrito por CIRIGLIANO & CARMAN (1983), contendo os mesmos nutrientes que o meio YMA, com a exceção do ágar.

2.4. Métodos Microbiológicos

2.4.1. Pré - Inóculo

Rhodotorula mucilaginosa foi cultivada no meio Yeast Mold Agar (YMA), à temperatura de 28°C, durante 24 horas. Inóculos de culturas de *Rhodotorula sp* foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de capacidade de 500mL, contendo 250mL de meio Yeast Mold Broth (YMB) e incubadas por 24 horas, sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 28°C, até a obtenção de 10^7 células / mL, servindo de pré-inóculo para a etapa seguinte.

2.4.2. Condições de Cultivo - Tratamento com Pireno

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio YMB adicionado de 0, 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL, inoculados com 6% (alíquotas de 15 mL do pré-inóculo) da suspensão celular de 10^7 células / mL e incubadas por 72 horas, à temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm. As amostras dos sobrenadantes foram coletadas durante o período de cultivo nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas. Alíquotas foram removidas para determinar o pH e a cinética de crescimento - viabilidade celular, tempo de geração (T_g) e velocidade específica de crescimento ($\mu_{esp.}$).

2.4.3. Determinação da Curva de Crescimento

O crescimento da linhagem de *Rhodotorula mucilaginosa* foi acompanhado durante os intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas de cultivo. O acompanhamento foi realizado através da contagem de células em Hemocitômetro de Neubauer.

2.4.4. Determinação da Velocidade Específica de Crescimento ($\mu_{\text{esp.}}$) e do Tempo de Geração (T_g)

Os parâmetros cinéticos estudados foram: velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{esp.}}$) e tempo de geração (T_g). Ambos os parâmetros foram determinados de acordo com a fórmula de PIRT (1975).

Para a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{esp.}}$) foi utilizada a equação:

$$\mu_{\text{esp}} = (\ln X - \ln X_0) / (T - T_0);$$

Onde: X: número máximo de células; X_0 : número inicial de células; T: tempo final; T_0 : tempo inicial. O tempo de geração (T_g) foi determinado pela fórmula:

$$T_g = \ln 2 / \mu_{\text{esp.}}$$

2.4.5. Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular das culturas, controle e tratadas com pireno, de *Rhodotorula mucilaginosa* foi acompanhada através do plaqueamento de 0,1 mL de cada cultura, apropriadamente diluída em tampão salina fosfato, pH 7,2, em meio YMA. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas. Após este intervalo as colônias formadas foram contadas; cada placa foi feita em triplicata e as alíquotas corresponderam aos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas de incubação. O número de colônias foi dado pela média dos valores obtidos nas três placas.

2.5. Testes Bioquímicos

2.5.1. Determinação do pH

As variações de pH dos meios de cultura foram acompanhadas ao longo do período de cultivo. O resultado do pH em cada ponto do intervalo correspondeu à média de cinco repetições. Posteriormente, uma curva de pH foi estabelecida com esses valores.

2.5.2. Determinação do Consumo de Glicose

Para determinar o consumo de glicose remanescente do meio de cultura, alíquotas de 5 mL do cultivo do fungo, em meio de cultura YMB, foram coletadas nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, foram dosadas por meio do método enzimático colorimétrico, utilizando o Kit Biosystems, para glicose oxidase, padrão da glicose 100 mg / dL e absorbância máxima em 500 nm. As leituras foram realizadas em Spectrophotometer Digital Spectronic, Model Genesys 2. Todos os valores apresentados foram médias de três repetições.

3. RESULTADOS

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento das culturas controle e tratadas com o pireno nas concentrações de 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL. Foi possível verificar que as culturas controle e tratadas apresentaram uma fase de adaptação, fase Lag, de aproximadamente 8 horas, seguida pelo aumento exponencial do crescimento que se prolongou até 48 horas de incubação. Após este período, estabeleceu-se a fase estacionária.

Analizando-se a mesma figura, observou-se que, a adição do pireno nas concentrações testadas teve influência sobre o crescimento das culturas de *Rhodotorula mucilaginosa*. As curvas apresentadas por essas culturas foram diferentes daquelas da cultura controle. Entretanto, a avaliação dos resultados obtidos para o tratamento com pireno mostrou que, nas concentrações de 0,5 mg / mL e 1 mg / mL ocorreu diminuição do crescimento. Por outro lado, a cultura tratada com a concentração de 0,25 mg / mL de pireno exibiu pequenas diferenças relacionadas ao crescimento quando comparada à amostra controle.

Os resultados apresentados na Figura 1 revelam que durante todo o período experimental, com 72 horas de crescimento, no meio de cultura YMB sem o pireno, o número de células viáveis foi de $2,73 \times 10^6$ (Ln = 16,38).

Entre as amostras tratadas com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL os valores foram $2,25 \times 10^6$ (Ln = 13,5), $2,07 \times 10^6$ (Ln = 12,42) e $1,28 \times 10^6$ (Ln = 7,68) respectivamente, com 72 horas de cultivo, apresentando redução de 17,58%, 24,17% e 53,11% no número de células viáveis.

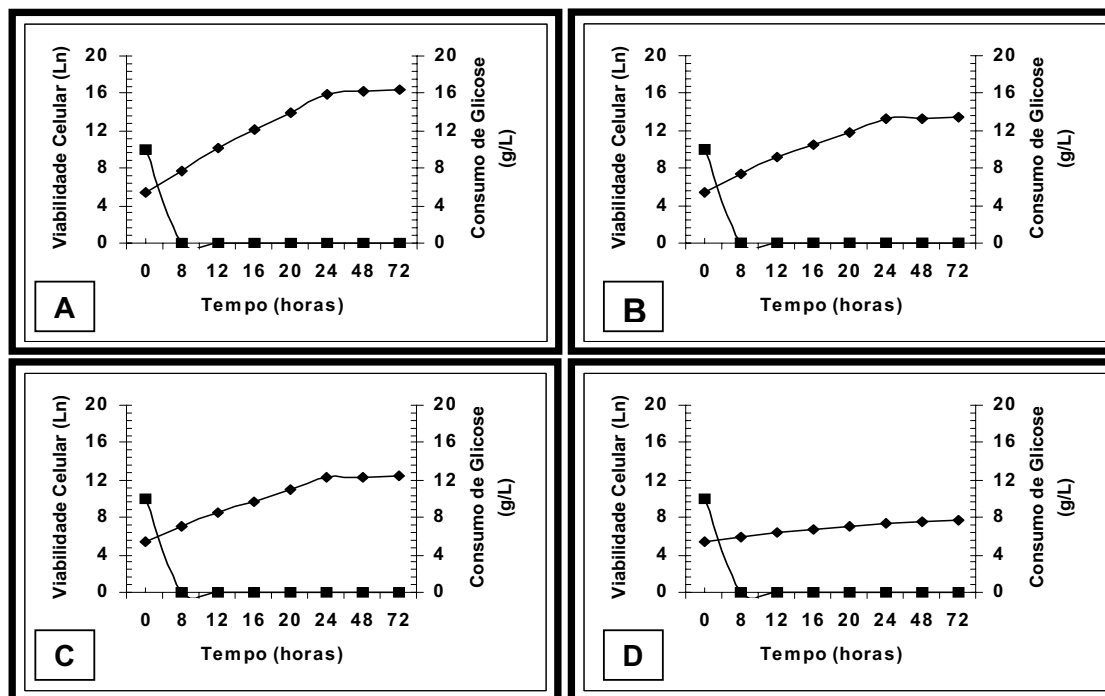


Figura 1. Efeito do Pireno sobre a Viabilidade Celular de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D). Viabilidade Celular (◊); Consumo de Glicose (◻)

O fungo *Rhodotorula mucilaginosa* foi capaz de crescer em presença de pireno, nas condições estudadas; porém bem menos em relação à amostra controle. As concentrações podem apresentar toxicidade à célula, dificultando o crescimento celular. O microrganismo estudado consumiu toda a glicose nas primeiras 8 horas de crescimento. Podendo-se sugerir que o fungo utilizou o pireno como fonte de carbono para garantir seu crescimento.

Com relação à curva de pH observou-se que a partir do inóculo das células de leveduras, nos meios de cultura controle e tratados, com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL de pireno, com pH inicial de 5,8, ocorreu uma redução de pH ao longo do período experimental. O controle apresentou redução de pH para 4,82 nas primeiras 24 horas de cultivo, seguindo de um decaimento progressivo para pH 3,77 ao término do período de cultivo. Essa rápida redução de pH nas primeiras 24 horas e o consumo de glicose evidencia a produção de metabólitos ácidos que proporcionam o crescimento celular. A amostra crescida em 1,0 mg / mL apresentou pH 5,57 no

período de 24 horas, chegando ao término do experimento com pH 3,87. As amostras tratadas com 0,25 mg / mL e 0,5 mg / mL de pireno, o pH foi 3,61 e 3,71 respectivamente, nas 48 horas de cultivo e 3,57 e 3,56 no período de 72 horas.

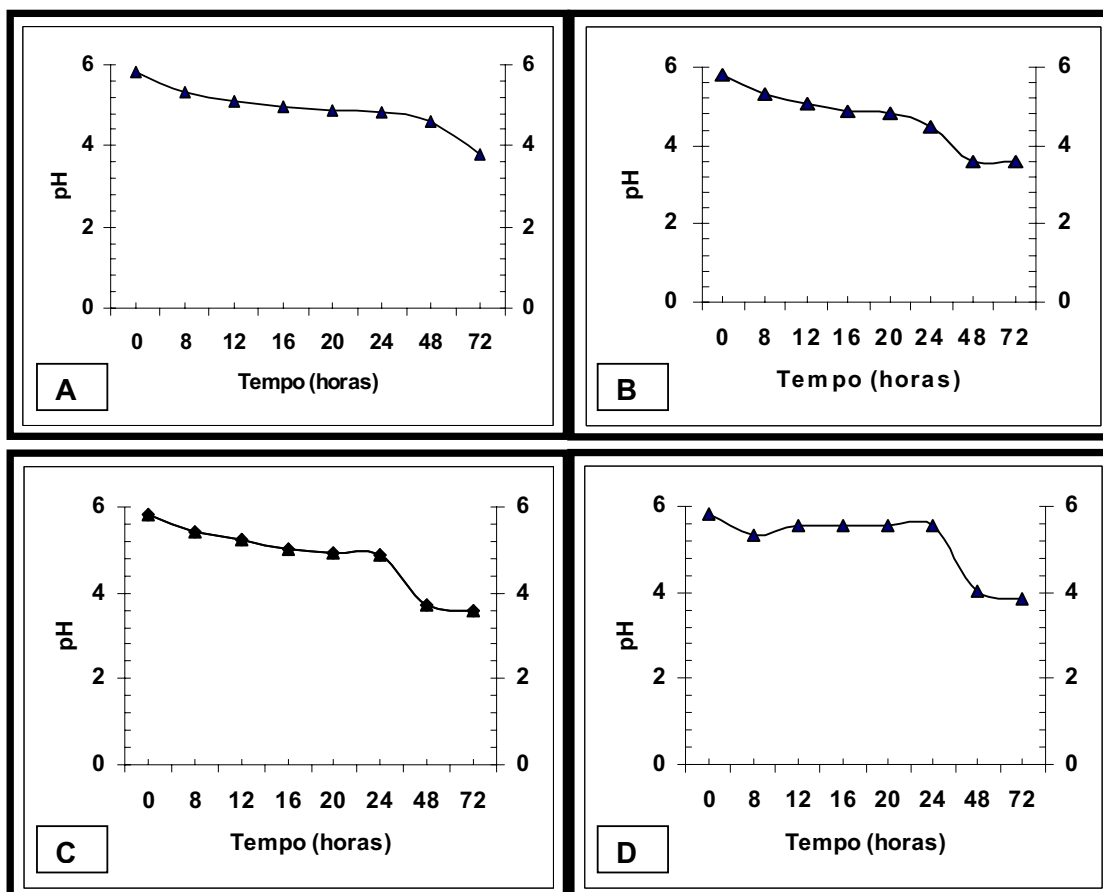


Figura 2. Efeito do Pireno sobre a variação de pH de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D)

A Tabela 1 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos estudados. Verificou-se que os valores da velocidade específica de crescimento ($\mu_{esp.}$) e tempo de geração (T_g), obtido para as culturas tratadas com pireno, nas diferentes concentrações, diferem daqueles obtidos para a cultura controle. Por outro lado, o tratamento da cultura tratada com pireno na concentração de 1 mg / mL demonstrou efeito inibidor de 50% em relação ao controle.

Tabela 1. Parâmetros Cinéticos de *Rhodotorula mucilaginosa* cultivado em presença e ausência de Pireno

Tempo (h)	Tempo de Geração (T _G)				Velocidade Específica de Crescimento (h ⁻¹)			
	ø	0,25 mg / mL	0,5 mg / mL	1 mg / mL	ø	0,25 mg / mL	0,5 mg / mL	1 mg / mL
8	2,38	2,85	3,62	10,6	0,290	0,243	0,191	0,065
12	1,73	2,19	2,70	7,87	0,402	0,316	0,256	0,088
16	1,66	2,15	2,59	8,15	0,416	0,321	0,267	0,085
20	1,62	2,13	2,50	8,25	0,427	0,324	0,277	0,084
24	1,59	2,13	2,44	8,34	0,434	0,326	0,284	0,083
48	3,08	4,21	4,84	16,2	0,225	0,165	0,143	0,043
72	4,55	6,13	7,14	21,6	0,152	0,113	0,097	0,032

Observou-se que os valores obtidos para as culturas tratadas foram significativamente diferentes daqueles observados para a cultura controle. A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{esp.}}$) para a cultura tratada com 1mg / mL foi relativamente baixa quando comparada com as outras culturas nos diferentes estágios de crescimento.

4. DISCUSSÃO

O entendimento dos mecanismos de ação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) sobre o crescimento de diferentes microrganismos, e em particular das leveduras, tem sido objeto de diversos estudos. As leveduras e os fungos filamentosos apresentam diversificado metabolismo que os habilitam a utilizarem uma enorme variedade de nutrientes e substratos, em diferentes condições ambientais (POTIN et al., 2004; SHKIDCHENKO, 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, apresenta viabilidade celular, sendo capaz de crescer, no meio de cultura contendo pireno, nas diferentes concentrações testadas. Contudo, não foi observado nenhum efeito deste composto estimulando o crescimento do microrganismo. Isto está possivelmente relacionado com o fato de que diferentes microrganismos, e especialmente o isolado de *Rhodotorula mucilaginosa*, podem se comportar de formas distintas, em resposta à presença de xenobióticos, como o pireno, no meio de cultura.

Trabalhos relacionados à toxicidade de compostos xenobióticos e metais pesados estão descritos na literatura. O efeito do cádmio, por exemplo, sobre o

crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904 mostram que o metal prejudica o crescimento e a viabilidade celular dessas leveduras. Paralelamente, estudos sobre o efeito de pH, temperatura e composição do meio de cultura sobre o crescimento de *Rhodotorula gracilis* mostram que estes parâmetros influenciam o crescimento celular do microrganismo. Da mesma forma, sabe-se que pode ocorrer inibição a partir dos metabólitos produzidos, ocasionando diferenças significativas na viabilidade celular e que o grau de toxicidade de determinado xenobiótico está diretamente relacionado com a estrutura molecular e a intensidade de interação com os diferentes componentes e metabólitos intracelulares produzidos, podendo ocasionar efeitos citotóxicos (SPOTHOLZ & ORDAL, 1956; MARIANO & BASSO, 2004).

Estudos realizados com *Trametes villosa* CCB176 mostram que interferências na composição do meio de cultivo sobre a produção de enzimas e sobre o crescimento reforçam a importância da compreensão dos requerimentos nutricionais de cada espécie para a aplicação biotecnológica de basidiomicetes (YAMANAKA et al., 2008).

O crescimento de um microrganismo é um processo complexo e altamente coordenado, que envolve muitos componentes celulares que acompanham o desenvolvimento e diferenciações celulares. A tendência básica do crescimento é exponencial, mas isto pode ser modificado por limitações físicas e nutricionais do ambiente. Geralmente, o metabolismo microbiano representa o balanço apropriado das combinações dos componentes, do meio de cultura, das propriedades químicas e físicas que induzem o crescimento e da síntese de constituintes essenciais ao organismo (GRIFFIN, 1994; VIJAYALAKSHMI et al., 2001; MUTNURI et al., 2005).

Foi possível observar, a partir dos resultados obtidos, que as culturas tratadas se comportaram de modos distintos em relação à concentração do pireno acrescido no meio de cultura. A concentração de 1 mg / mL de pireno causou uma drástica redução no crescimento do microrganismo, quando comparado com as outras concentrações de 0,25 mg / mL e 0,5 mg / mL.

Desse modo, pode-se sugerir que os resultados obtidos neste trabalho sobre o efeito do pireno nos diferentes estágios de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, provavelmente, está relacionado com a toxicidade do xenobiótico. Os

compostos aromáticos, normalmente, produzem efeitos tóxicos ao nível de membrana, em consequência direta da alta correlação que há entre a toxicidade do composto e a hidrofobicidade da célula. Além disso, a resposta celular as diferentes concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ou a um outro composto recalcitrante, está possivelmente relacionado às características fisiológicas particulares de cada organismo estudado (KOMARKOVA et al., 2003; MUTNURI et al., 2005).

5. CONCLUSÕES

O efeito do pireno nas diferentes concentrações testadas, 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL, diminuiu o crescimento celular de *Rhodotorula mucilaginosa*, mesmo sendo um microrganismo, reconhecidamente, resistente a fatores estressantes. Apesar disto, nota-se claramente, minimizando os efeitos deletérios do xenobiótico. O hidrocarboneto aromático policíclico, pireno, apresentou efeito tóxico sobre a levedura *Rhodotorula sp*, exibindo redução nas diferentes fases de crescimento, principalmente para a cultura tratada com 1 mg / mL. Os valores obtidos mostram que o crescimento do microrganismo reflete o estado fisiológico de estresse celular ao qual a levedura foi submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à CAPES pela Bolsa de Doutorado concedida ao primeiro autor, à Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pelo apoio e ao CNPq, FINEP, PRONEX pelo suporte técnico e financeiro na execução deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BERGAUER, P.; FONTEYNE, P. A.; NOLARD, N.; SCHINNER, F.; MARGESIN, R. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*, v.59, p.909-918, 2005.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Biology of microorganisms*. 7^a ed. (New Jersey, Prentice Hall, 1994). 909p.

CIRIGLIANO, M. C. & CARMAN, G. M. A plating technique for the selective isolation of yeast utilizing water miscible carbon. *J. Food Scienc*, v.48, p.1554-1555, 1983.

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

JUAREZ-RAMIREZ, C.; RUIZ-ORDAZ, N.; CRISTIANE-URBINA, E.; GALINDEZ-MAYER, J. Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of *Candida tropicalis* in a fluidised bed reactor. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.17, p.697-705, 2001.

KOMARKOVA, E.; PACA, J.; KLAPKOVA, E.; STIBOROVA, M.; SOCCOL, C. R.; SOBOTKA, M. Physiological changes of *Candida tropicallis* population degradation phenol in fed batch reactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, n.4, p.537-543, 2003.

MARIANO DA SILVA.; BASSO, L.C. Efeitos do cádmio sobre o crescimento da leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904 e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. *Ciênc. Tecn. Alimen*, v.24, n.1, p. 16-22, 2004.

MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous phase liquids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. New York, v.67, n.4, p.569-576, 2005.

PIRT, S. J. Principles of Microbe and Cell Cultivation. London: (Blackwell Scientific Publications, 1975). 274p.

POPTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. International Biodeterioration and Biodegradation. Oxford, v. 54, n.1, p.45-52, 2004.

RUIZ-ORDAZ, N.; HERNANDEZ-MANZANO, E.; RUIZ-LAGUNEZ, J. C.; CRISTIANE-URBINA, E.; GALINDEZ-MAYER, J. Growth kinetic model that describes the inhibitory and lytic effects of phenol on *Candida tropicalis* yeast. Biotechnol Prog, v.14, p.966-969, 1998.

SHKIDCHENKO, A. N. Physiological aspects of intensifying yeast growth. Applied Biochemistry and Microbiology, v.42, n.2, p.190-194, 2006.

SPOTHOLZ, C.H.; LITCHFIELD, J.H.; ORDAL, Z.J. The effect of pH, temperature, and composition of the medium on growth characteristics of *Rhodotorula gracilis*. Department of food technology, University of Illinois, p. 285-287, 1956.

VIJAYALAKSHMI, G.; SHOBHA, B.; VANAIAKSHI, V.; DIVAKAR, S.; MANOHAR, B. Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutant strain of *Rhodotorula gracilis*. Eur Food Res Technol, v.213, p.234-239, 2001.

YAMANAKA et al. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. Brazilian Journal of Microbiology, v.39, p. 78-84, 2008.

Segundo Artigo:

EXPRESSÃO DA LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) PRODUZIDAS POR *Rhodotorula mucilaginosa* EM PRESENÇA DE PIRENO

Trabalho a ser submetido para a revista Archives of Microbiology
Fator de Impacto: 1,838

EXPRESSÃO DA LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) PRODUZIDAS POR *Rhodotorula mucilaginosa* EM PRESENÇA DE PIRENO

Petrusk Homero Campos Marinho^{a,b}, Patrícia Mendes de Souza^{a,c}, Aline
Elesbão do Nascimento^a, Galba Maria de Campos Takaki^{a,b,c}

^aNúcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^bPrograma de Pós - Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE,
Brasil

^cPrograma de Pós Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author. Tel: +55-81-21194017; Fax: +55-81-21194043

E-mail address: gmctakaki@pesquisador.cnpq.br (Campos-Takaki, G.M.)

RESUMO

O comportamento de *Rhodotorula mucilaginosa* foi investigado frente à presença de pireno, um Hidrocarboneto Aromático Policíclico (HAP), para avaliar a atividade de expressão da lacase e manganês peroxidase (MnP). O microrganismo foi cultivado em meio de cultura Yeast Mold Broth (YMB) na ausência e presença de pireno nas concentrações de 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL. A atividade da lacase e manganês peroxidase foi medida espectrofotometricamente em 525 nm e 610 nm, respectivamente, a partir das amostras dos sobrenadantes, coletadas durante 72 horas, sob agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 28°C. Os resultados obtidos revelaram diferenças relativas quanto à expressão das enzimas, nas diferentes concentrações de pireno. O nível máximo detectado foi de 1,83 UI / L para Lacase, seguido de 0,76 UI / L para Manganês Peroxidase (MnP), sugerindo sua possível aplicabilidade em estudos de biorremediação em áreas contaminadas com Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. Através do estudo por cromatografia (HPLC) verificou-se que não houve detecção de pireno relacionadas às concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Por outro lado, em presença de 1 mg/mL foram verificados valores remanescentes de pireno.

Palavras - Chave: *Rhodotorula mucilaginosa*; Pireno; Lacase; Manganês Peroxidase (MnP).

ABSTRACT

The behavior of *Rhodotorula mucilaginosa* was investigated in the presence of pyrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), to assess the activity of expression of laccase and manganese peroxidase (MnP). The organism was grown in culture medium Yeast Mold Broth (YMB) in the absence and presence of pyrene in concentrations of 0.25 mg / mL, 0.5 mg / mL and 1 mg / mL. The activity of laccase and manganese peroxidase was measured spectrophotometrically at 525 nm and 610 nm, respectively, from the samples of the supernatants were collected for 72 hours, under orbital agitation of 150 rpm and 28 ° C. The results revealed differences in how the expression of enzymes in different concentrations of pyrene. The maximum level detected was 1.83 IU / L for Laccase, followed by 0.76 IU / L for manganese peroxidase (MnP), suggesting its potential applicability in bioremediation studies in areas contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. By studying chromatography (HPLC) showed that there was no detection of pyrene related to concentrations of 0.25 mg / mL and 0.5 mg / mL. Moreover, in the presence of 1 mg / mL were observed remaining values of pyrene.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*; Pyrene; Laccase; Manganese Peroxidase (MnP).

1. INTRODUÇÃO

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais. Muitos desses compostos podem ser considerados precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos. Essas substâncias são extremamente lipossolúveis e apresentam rápida absorção pelos pulmões, intestinos e pele de homens e animais. Uma vez absorvidos pelas células, são metabolicamente ativados e, desta maneira, tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes, por exemplo, em macromoléculas celulares, como o DNA. Esta indução mutagênica é considerada essencial na carcinogenicidade química desses xenobióticos. Neste sentido, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de se entender o destino e as formas de desaparecimento dessas substâncias, visando o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes nos processos de remoção destes compostos (ALEXANDER et al., 2002; TALLEY et al., 2002; BANFORTH & SINGLETON, 2005; LIANG et al., 2008).

Dentre os fungos, os Basidiomicetos, e principalmente o gênero *Rhodotorula*, apresenta a habilidade de degradar e metabolizar uma enorme variedade de compostos xenobióticos, considerando o seu sistema enzimático ligninolítico, que o torna apto para mineralizar hidrocarbonetos e conseqüentemente, remediar ecossistemas contaminados. (ROMERO et al., 1998; HOFRICHTER, 2002; MISHRA & BISARIA, 2006).

As enzimas do sistema enzimático ligninolítico, presentes principalmente em Basidiomicetos, apresentam a capacidade de catabolizar a degradação de compostos recalcitrantes, devido ao fato de apresentarem inespecificidade pelo substrato, ou seja, à presença de outras substâncias, como por exemplo, as moléculas aromáticas e, desta maneira, podem ser reconhecidos pelo sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, que sejam quimicamente transformados. Assim sendo, torna-se cada vez mais evidente a possibilidade de utilização de microrganismos com habilidades de remover e/ou degradar compostos tóxicos do ambiente (HIGUCHI, 1989; TOUR et al., 1995; HOFRICHTER, 2002; JOHNSEN et al., 2005).

Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a influência do pireno, sobre a expressão das enzimas Lacase e Manganês Peroxidase

(MnP) por *Rhodotorula mucilaginosa*, como também avaliar a porcentagem de remoção do pireno nas condições estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Foi utilizada *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1003, gentilmente cedida pelo Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife - PE, Brasil; cadastrada no WFCC (*World Federation Culture Collection*). O microrganismo foi mantido no meio Yeast Mold Agar (YMA), sob refrigeração, à temperatura de 4°C. Paralelamente, repiques sucessivos foram realizados a cada 30 dias para manter a viabilidade.

2.2. Substrato

O Hidrocarboneto Aromático Policíclico (HAP) utilizado neste experimento foi o Pireno (SIGMA). O hidrocarboneto foi solubilizado em acetona 70%.

2.3. Meios de Cultura

2.3.1. Meio de Manutenção

Para manutenção foi utilizado o meio Yeast Mold Agar (YMA) descrito por CIRIGLIANO & CARMAN (1983), constituído dos seguintes nutrientes: Extrato de Levedura - 0,3 %; Extrato de Malte - 0,3 %; Peptona 0,5 %; D - Glicose - 1,0 % e Agar - 1,5 %. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com uma solução de NaOH 1M ou HCl 1M.

2.3.2. Meio de Crescimento

Foi utilizado o meio Yeast Mold Broth (YMB), também descrito por CIRIGLIANO & CARMAN (1983), contendo os mesmos nutrientes que o meio YMA, com a exceção do ágar.

2.4. Métodos Microbiológicos

2.4.1. Pré - Inóculo

Rhodotorula mucilaginosa foi cultivada no meio Yeast Mold Agar (YMA), à temperatura de 28°C, durante 24 horas. Inóculos de culturas de *Rhodotorula mucilaginosa* foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de capacidade de 500mL, contendo 250mL de meio Yeast Mold Broth (YMB) e incubadas por 24 horas, sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 28°C, até a obtenção de 10^7 células / mL, servindo de pré-inóculo para a etapa seguinte.

2.4.2. Condições de Cultivo - Tratamento com Pireno

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio YMB adicionado de 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL, inoculados com 6% (alíquotas de 15 mL do pré-inóculo) da suspensão celular de 10^7 células / mL e incubadas por 72 horas, à temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm. As amostras dos sobrenadantes foram coletadas durante o período de cultivo nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas. Alíquotas foram removidas para determinação do pH, proteínas totais, lacase e manganês peroxidase (MnP).

2.5. Testes Bioquímicos

2.5.1. Determinação do pH

As variações de pH dos meios de cultivos foram acompanhadas ao longo do período de 72 horas. O resultado do pH em cada ponto do intervalo correspondeu à média de cinco repetições.

2.5.2. Determinação das Proteínas Totais

O teor de proteínas totais foi determinado a partir do líquido metabólico livre de células nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas. A dosagem foi realizada pelo Kit Labtest, onde os íons cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas formando um heteropolímero de

cor azul, tendo como padrão 4,0 g / dL de albumina bovina e absorvância máxima à 545 nm.

2.5.3. Determinação das Atividades Enzimáticas

A Lacase foi medida espectrofotometricamente, através da oxidação da Siringaldazina à 525 nm ($\epsilon_{525} = 65000 \text{ dm}^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura de reação consistiu de 0,2 mL de Tampão Citrato Fosfato 0,5M, pH 5,0; 0,1 mL de Siringaldazina 0,2 mM (dissolvida em etanol 60%); 0,6 mL do sobrenadante da cultura e 0,1 mL de Peróxido de Hidrogênio 1 mM (SZKLARZ et al., 1989). A reação teve início pela adição da Siringaldazina e foi acompanhado pelo aumento da absorvância à 525 nm durante 10 minutos.

A atividade da Manganês Peroxidase (MnP) foi medida espectrofotometricamente através da oxidação do Vermelho de Fenol à 610 nm ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ dm}^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura de reação continha 0,5 mL do sobrenadante da cultura; 0,1 mL de Vermelho de Fenol 0,1%; 0,1 mL de Lactato de Sódio 0,1M; 0,2 mL de Albumina Bovina 0,5%; 0,05 mL de Sulfato de Manganês 2 mM e 0,05 mL de Peróxido de Hidrogênio 2 mM, preparado em Tampão Succinato de Sódio 20 mM, pH 4,0 (KUWAHARA et al., 1984). A reação teve início pela adição do Vermelho de Fenol e foi acompanhado pelo aumento da absorvância em 610 nm, durante 10 minutos.

A conversão de abs / s (absorvância por segundo) em UI / L ($\mu\text{moles por minuto por litro}$) efetuou-se o seguinte cálculo baseado no coeficiente de extinção molar de um produto de reação, com a absorvância: $(A \text{ da amostra} / \epsilon \cdot d) \cdot 10^6 \cdot (1 / T) \cdot (V_t / V_s) = \text{UI} / \text{L}$, onde A: valor da absorvância da amostra; ϵ : coeficiente de extinção molar; d: diâmetro do tubo de ensaio (meio óptico) em centímetros; 10^6 : fator de conversão de moles por litro ou milimoles por mililitro em micromoles por litro; T: o tempo de reação em minutos; V_t : é o volume total do teste e V_s : o volume da amostra. Para todas as enzimas uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto. Todos os valores apresentados foram médias de cinco repetições.

2.5.4. Extração líquido / líquido e análise CCD e CLAE

O líquido metabólico proveniente do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* nos meios de cultura YMB, em presença e ausência de pireno, nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL foi submetido à extração com acetato de etila, utilizando um funil de separação. A extração foi realizada três vezes e os extratos foram reunidos, em seguida, filtrados em filtro de papel e rotaevaporados. O extrato obtido foi pré-purificado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatoplasas (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck), utilizando uma solução de pireno (2 g/L) como padrão. O benzeno foi empregado como eluente para permitir a separação do pireno residual. As bandas foram visualizadas através de luz UV (254 nm). Para as análises quantitativas, as bandas identificadas nas placas de CCD foram removidas e solubilizadas com 20 mL de acetona, posteriormente centrifugados e concentrados para análise em CLAE. Uma amostra de 10 µL do extrato foi analisada utilizando-se uma coluna C18 (Varian). A fase móvel utilizada foi acetonitrila 100%, fluxo de 1 mL/min e detector de UV configurado para 254 nm (SALICIS et al., 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à curva de pH demonstram que a partir do inóculo das células de leveduras de *Rhodotorula mucilaginosa* no meio de cultura YMB controle e tratado com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno, com pH inicial de 5,8, ocorreu uma diminuição ao longo do período experimental (Figura 1). A amostra controle, sem pireno, apresentou redução de pH para 4,82 nas primeiras 24 horas de cultivo, seguindo para uma diminuição progressiva para pH 3,77 ao término do cultivo. Esta redução do pH nas primeiras 24 horas evidencia a produção de metabólitos ácidos. A amostra crescida em 0,25 mg / mL apresentou no período de 24 horas pH 4,49, chegando ao término do experimento com pH 3,57. As amostras tratadas com 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno, apresentaram pH 4,86 e 5,57 respectivamente, no período de 24 horas de cultivo e, ao final do experimento, houve um decaimento da curva de pH para 3,56 e 3,87, no período de 72 horas de cultivo (Figura 1).

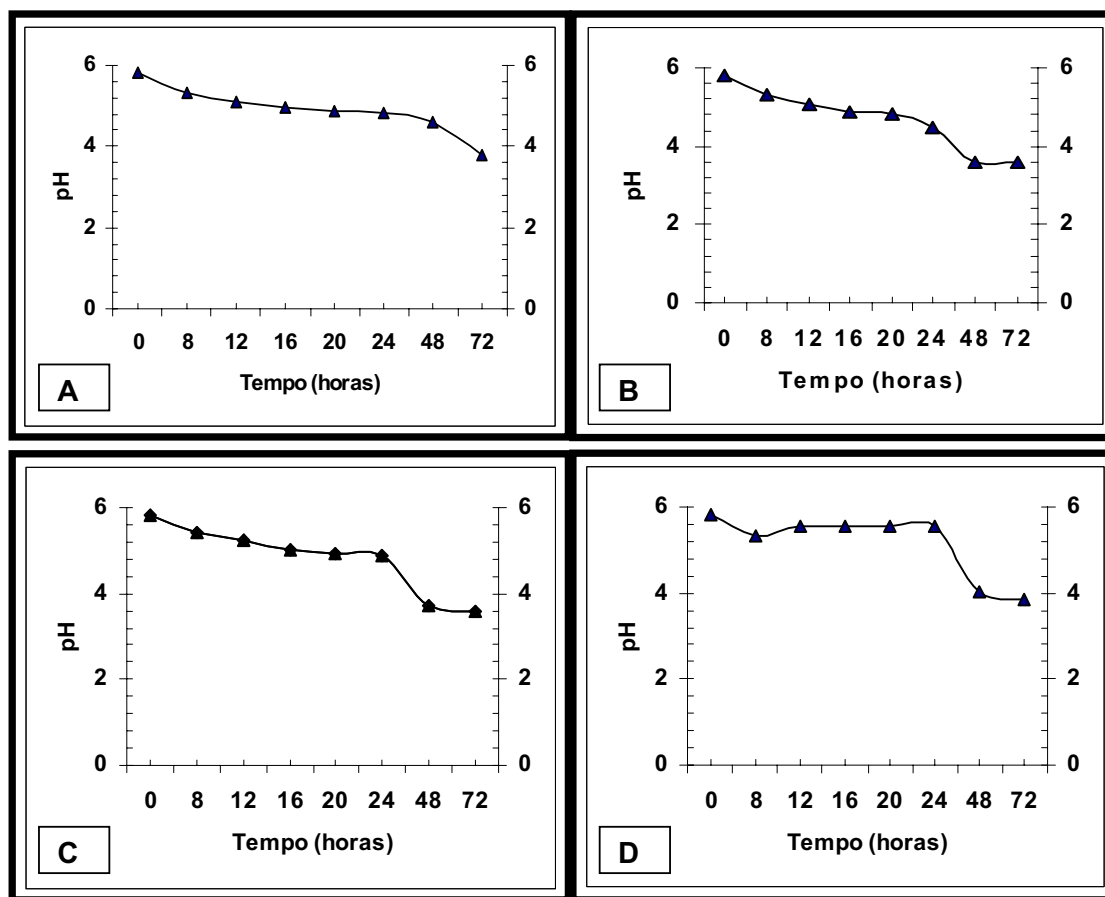


Figura 1. Efeito do Pireno sobre o pH de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D).

Os fungos, de um modo geral, são extremamente versáteis em suas respostas em função das variações ambientais. Respostas celulares e comportamentos fisiológicos relacionados à resistência / tolerância, em presença de xenobióticos, podem resultar na indução de alterações intracelulares relacionadas com processos de oxi-redução. O efeito do pH, temperatura e composição do meio de crescimento de *Rhodotorula gracilis*, por exemplo, em presença de fenantreno foi observado e melhor estudado no pH 6,5. Resultados obtidos da degradação do pireno por leveduras e fungos filamentosos utilizando glicose como co-substrato evidenciaram comportamentos diferenciados (THAM et al., 1999; KITAMOTO et al., 1999; KIHARA et al., 1999; ROMERO et al. 2002; KIM et al., 2004).

Os resultados referentes ao conteúdo de proteínas extracelulares demonstram que o controle apresentou 378 mg / dL de proteínas extracelulares no período de 24 horas de cultivo. A amostra tratada com 0,25 mg / mL exibiu o maior conteúdo de proteínas totais 438 mg / dL nas primeiras 24 horas de cultivo, com acréscimo de aproximadamente 15,9% em relação ao controle. As amostras tratadas com 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno apresentaram conteúdos de 258 mg / dL e 338 mg / dL, respectivamente, dados inferiores em relação a amostra controle, apresentando redução no conteúdo das proteínas totais cerca de 31,7% e 10,5%, respectivamente. Observou-se ao final do experimento que a amostra controle apresentou um decréscimo de cerca de 14,2% no conteúdo protéico em relação ao início do experimento. As amostras tratadas com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL apresentaram redução de cerca 18,4%, 35,1% e 5,58%, respectivamente, do conteúdo de proteínas em relação às primeiras 24 horas de crescimento do microrganismo (Tabela 1).

Duas enzimas oxidativas foram determinadas neste experimento: a Lacase e a Manganês Peroxidase (MnP). O isolado de *Rhodotorula mucilaginosa* foi cultivado em meio de cultura YMB, suplementado com pireno nas concentrações de 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL. Foi possível verificar, através dos resultados obtidos, que o isolado de *Rhodotorula mucilaginosa* demonstrou padrões diferenciados quanto à expressão das enzimas estudadas (Tabela 1). Os resultados relativos à atividade enzimática da Lacase demonstrou que a amostra controle apresentou 1,21 UI / L no período de 48 horas de cultivo. A amostra tratada com 0,25 mg / mL de pireno apresentou o maior conteúdo de Lacase 1,85 UI / L nas primeiras 48 horas de cultivo, com acréscimo de 52,8% de rendimento em relação à amostra controle. As amostras tratadas com 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno apresentaram conteúdos de 1,83 UI / L e 1,79 UI / L, respectivamente, dados superiores em relação à amostra controle, apresentando rendimento no conteúdo da enzima de 51,2% e 47,9%, respectivamente. Observou-se ao final do experimento, período de 72 horas de cultivo, que a amostra controle exibiu uma diminuição de 3,74% no conteúdo protéico em relação ao início da fase experimental. As amostras tratadas com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno exibiram redução de 3,78%, 3,82% e 6,14% em relação às primeiras 48 horas de crescimento do microrganismo. Paralelamente, a

atividade da Manganês Peroxidase (MnP), também, foi medida espectrofotometricamente. A análise demonstrou que a amostra controle apresentou 0,58 UI / L no período de 24 horas de cultivo. A amostra tratada com 0,25 mg / mL de pireno apresentou o maior conteúdo de manganês peroxidase (MnP) 0,76 UI / L nas primeiras 24 horas de cultivo, com acréscimo de 31% de rendimento em relação à amostra controle. As amostras tratadas com 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno apresentaram conteúdos de 0,67 UI / L e 0,63 UI / L, respectivamente, dados superiores em relação à amostra controle, apresentando rendimento no conteúdo da enzima de 15,51% e 8,62%, respectivamente. Observou-se ao término do experimento, período de 72 horas de incubação, que a amostra controle exibiu um decréscimo de 12,5% no conteúdo protéico em relação ao início do experimento. As amostras tratadas com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno apresentaram redução de 14,47%, 10,44% e 7,94% em relação às primeiras 24 horas de crescimento do microrganismo. Os resultados demonstram que em todas as condições testadas o maior conteúdo de Lacase foi observado no intervalo de 48 horas de crescimento. Por outro lado, a maior expressão de atividade da enzima manganês peroxidase (MnP) foi observado nas primeiras 24 horas de crescimento, demonstrando maior atividade celular neste período (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade Enzimática de *Rhodotorula mucilaginosa* em diferentes concentrações de pireno. Controle (0); 0,25 mg/ mL; 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL. Proteínas Totais; Lacase; Manganês Peroxidase

Tempo (horas)	Proteínas Totais (g / dL)				Lacase (UI / L)				Manganês Peroxidase (UI / L)			
	0	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	0	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	0	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL
8	0,48	0,537	0,398	0,358	1,07	1,08	1,15	1,12	0,4	0,54	0,54	0,58
12	0,3	0,318	0,318	0,318	1,08	1,08	1,2	1,15	0,5	0,73	0,65	0,59
16	0,48	0,378	0,398	0,278	1,12	1,45	1,48	1,39	0,45	0,7	0,7	0,6
20	0,48	0,358	0,358	0,278	1,09	1,51	1,6	1,57	0,18	0,25	0,31	0,49
24	0,38	0,438	0,258	0,338	1,2	1,83	1,8	1,75	0,58	0,76	0,67	0,63
48	0,38	0,338	0,358	0,278	1,21	1,85	1,83	1,79	0,54	0,72	0,62	0,59
72	0,36	0,378	0,338	0,278	1,03	1,78	1,76	1,68	0,35	0,65	0,6	0,58

As maiores atividades enzimáticas detectadas estiveram relacionadas à produção de Lacase. O nível máximo detectado foi de 1,85 UI / L, seguida de 1,83 UI / L. De acordo com a literatura a atividade da Lacase e Manganês Peroxidase tem sido observada em vários fungos da podridão branca. A produção destas enzimas

provavelmente resulta de modificações fisiológicas características do metabolismo primário e secundário, sob diferentes condições e de acordo com os tipos de substratos (BOOMINATHAN et al., 1993; REDDY & SOUZA, 1994).

A atividade enzimática da Lacase e Manganês Peroxidase (MnP) foram observadas nas culturas controle e tratadas dos sobrenadantes de *Rhodotorula mucilaginosa*. Foi possível verificar que as amostras dos sobrenadantes do microrganismo cultivado, nas diferentes concentrações de pireno, apresentaram resultados distintos quando comparados com as amostras controle, sem o hidrocarboneto. A produção de MnP e Lacase pelo fungo pode ser considerada eficiente, principalmente se comparar esta atividade com outras, obtidas por outros estudos com fungos reconhecidamente ligninolíticos (ARORA et al., 2002).

A produção de MnP e Lacase está aparentemente limitada a certos fungos Basidiomicetos degradadores de Lignina, mas não está descartada, também, a possibilidade de que outros fungos possam produzir. Nas últimas décadas foram descritos, em inúmeros trabalhos, possíveis substratos para estas enzimas, entre os quais poluentes orgânicos recalcitrantes, como os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (HOFRICHTER, 2002).

Foi encontrado para a Lacase nas amostras tratadas com 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1,0 mg / mL de pireno, atividades variando de 1,08 UI / L a 1,85 UI / L. O intervalo de cultivo com produção mais alta foi 24 e 48 horas. Entretanto, os valores obtidos neste trabalho podem ser considerados eficientes aos obtidos por outras espécies de fungos, como *Coriolo versicolor* e *Funalia trogii*, *Trametes trogii*, levando-se em conta a presença de pireno no meio de cultura, extremamente recalcitrante (KAHRAMAN & GURDAL, 2002).

Os Basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, porém elas podem ser induzidas pelas condições de cultivo. Diversas substâncias, incluindo compostos aromáticos e fenólicos têm sido utilizadas como indutores enzimáticos com o objetivo de aumentar a produção de enzimas ligninolíticas. Têm se avaliado o tipo, a concentração e o tempo de adição dos indutores para estimular a produção destas enzimas (GALLAUP et al., 2002; RABINOVICH et al., 2004; PAZARLIOGLU et al., 2005).

A produção das enzimas Lacases e Manganês Peroxidases estão na dependência tanto da fonte de carbono como de nitrogênio. Diversos autores estudaram o efeito de diferentes fontes, principalmente, de nitrogênio orgânico na produção de Lacases por *T. Pubescens*. A maior produção da enzima foi obtida quando utilizada a peptona como única fonte de nitrogênio. A substituição por extrato de levedura levou a um decréscimo na produção da enzima, porém o crescimento do microrganismo não foi, de forma alguma, afetado. Neste trabalho foi utilizada como fonte de nitrogênio a peptona, o que talvez possa explicar as concentrações encontradas (GIANFREDA et al., 1999; POINTING et al., 2000).

Para que a aplicação da Lacase e Manganês Peroxidase (MnP) seja realizada com sucesso, é necessário que a sua produção seja feita em grandes quantidades. Por isso, além de se estudar os fatores ambientais da produção, muitos autores têm considerado a adição de indutores ao meio de cultura. O indutor pode ser o substrato da própria enzima ou um composto estruturalmente análogo. No caso da Lacase os compostos aromáticos são os mais promissores. Deste modo, pode-se aumentar a produção da Lacase numa grande variedade de fungos pela indução por compostos aromáticos. A composição do meio de cultura também é um fator importante na produção da enzima (JANG et al., 2002).

Outro importante fator na produção das enzimas é o pH do meio de cultura. Ele pode afetar a atividade e estabilidade das mesmas. A maioria dos fungos tolera o pH num intervalo alargado de 4-9, enquanto que a enzima é mais sensível as variações do pH. As enzimas extracelulares são produzidas em maiores quantidades em pH próximo do pH ótimo da sua atividade (O'CALLAGHAN et al., 2002).

Os resultados obtidos referentes à quantificação do pireno residual estão ilustrados na Tabela 2. Observa-se que houve elevados percentuais de remoção de pireno por *Rhodotorula mucilaginosa* cultivada em meio YMB suplementado com pireno nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. Foi possível observar através do estudo por cromatografia (CLAE) que não houve detecção de pireno nos diferentes intervalos de tempo para as amostras de *Rhodotorula* submetidas às concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Por outro lado, em presença de 1 mg/mL foram verificados os seguintes valores remanescentes de pireno em relação a concentração inicial (1 mg/mL) 1,1%, 1%, 0,5%, 0,5%, 0,1%,

0,1% e 0% nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas, respectivamente. 0,011 mg/mL, 0,010 mg/mL, 0,005 mg/mL, 0,005 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,001 mg/mL e 0 mg/mL nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Devido ao elevado percentual de remoção demonstrado, acredita-se que além da biodegradação, interações de componentes de superfície de parede celular, tenham sido responsáveis pela remoção do pireno no meio de cultura testado. É possível que a bioadsorção constitua um pré-requisito para os processos de biotransformação (ALEXANDER, 1994; GADEN, 2000).

Tabela 2. Quantificação do pireno residual em meio de cultura YMB cultivado com *Rhodotorula mucilaginosa* suplementado com Pireno. N / D (Não Detectado)

Tempo (Horas)	Concentração de Pireno / Remanescente (mg/mL)			Percentual (%)		
	0,25	0,5	1	0,25	0,5	1
8	N / D	N / D	0,011	-	-	1,1
12	N / D	N / D	0,010	-	-	1
16	N / D	N / D	0,005	-	-	0,5
20	N / D	N / D	0,005	-	-	0,5
24	N / D	N / D	0,001	-	-	0,1
48	N / D	N / D	0,001	-	-	0,1
72	N / D	N / D	N / D	-	-	-

A habilidade dos fungos em remover e degradar compostos xenobióticos e sua capacidade de sobrevivência em diferentes nichos é consequência direta da evolução dos sistemas enzimáticos. Seus arsenais enzimáticos e respostas metabólicas, sem dúvida, conferem algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas. Entre os fungos, *Rhodotorula* tem sido reportado por exibir a capacidade de oxidar e degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs),

considerados agentes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos (ROMERO et al., 2002).

A oxidação do pireno por fungos como *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Rhodotorula glutinis* está documentada na literatura. Esses organismos exibem a potencialidade de metabolizar esse composto como fonte única de carbono, porém estudos revelaram que a presença de um co-substrato aumenta a atividade de remoção deste xenbiótico (WUNDER et al., 1994; LAUNEN et al., 1999; ROMERO et al., 2002; KRALLISH et al., 2006; WANG et al., 2007).

Alguns trabalhos relatam a remoção de elevadas concentrações de compostos recalcitrantes em poucas horas de contato. Estudos com *Cunninghamella elegans* mostraram remoção de 85% do corante verde malaquita e formação de outros compostos tóxicos após 24 horas de cultivo. Por outro lado, a cinética de degradação do pireno por *Mucor racemosus* e *Phialophora alba* em presença e ausência de glicose demonstrou taxa de remoção / degradação de 80% do pireno em 48 horas de cultivo (CHA et al., 2001; RAVELET et al., 2001).

A cinética de remoção do pireno também foi avaliada em cultura contínua de linhagens de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 (selvagem) e *R. arrhizus* UCP 402 (mutante). Os resultados demonstraram elevado potencial de remoção do composto, embora tenham evidenciado taxas diferentes entre as linhagens selvagem e mutante. A linhagem mutante demonstrou uma velocidade maior na remoção quando comparado com a linhagem selvagem 99,2% e 99,6% respectivamente, após 72 horas de cultivo em meio YMB, sendo que 58% e 65% foram removidos nas primeiras 12 horas de incubação. Os experimentos realizados com meio de cultura Sabouraud Sacarose também evidenciaram taxas elevadas de remoção, 97,4% e 99% para as linhagens selvagem e mutante, respectivamente (SHIOSAKI, 2005).

De uma forma geral os fungos 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 do meio ambiente. O padrão de atividade de 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. Os fungos têm sido utilizados para o tratamento de resíduos e rejeitos

industriais e urbanos. O potencial de uso reside em seu arsenal de enzimas, produzido em resposta ao ambiente e secretado como metabólito secundário (FU & VIRARAGHAVAN, 2002; LOYD, 2002).

Este tipo de estudo é um método relativamente simples para avaliar a capacidade degradativa dos microrganismos. Os resultados sugerem que *Rhodotorula mucilaginosa* apresenta a potencialidade para remover e degradar aromáticos. Para testar a eficiência deste fungo como degradador serão necessários estudos posteriores com a finalidade de explorar o potencial biotecnológico destas fontes alternativas de enzimas.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que há produção das enzimas Lacase e Peroxidase Manganês (MnP), quando *Rhodotorula mucilaginosa* foi incubado em meio de cultura contendo pireno, fato que leva a supor que este microrganismo apresenta a potencialidade de degradar, e que possivelmente tem influência neste processo, pois exibiu atividade durante o período de incubação. Os dados apresentados neste trabalho indicam que *Rhodotorula mucilaginosa* tem potencial para ser empregado em processos de degradação ou no tratamento de compostos xenobióticos, entretanto, existe a necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos utilizados por este microrganismo para o desenvolvimento de tecnologias para a aplicação do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à CAPES pela Bolsa de Doutorado concedida ao primeiro autor, à Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pelo apoio e ao CNPq, FINEP, PRONEX pelo suporte técnico e financeiro na execução deste trabalho.

5. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, R.R., TANG, J.X. and ALEXANDER, M. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **J. Environ. Qual**, v. 31, p. 150-154, 2002.

ARORA, D.S.; CHANDER, M.; GILL, P.K Involvement of lignin peroxidase, manganes peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.50, p. 115-120, 2002.

BANFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p. 723-736, 2005.

BOOMINATHAN, K.; SOUZA, T.M.; NAIDU, P.S.; DOSORETZ, C.G.; REDDY, C.A. Temporal expression of the major lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p. 3446-3450, 1993.

CIRIGLIANO, M.C. & CARMAN, G.M. A plating technique for the selective isolation of yeast utilizing water miscible carbon. **J. Food sci**, v.48, p. 1554-1555, 1983.

HIGUCHI, T. Mecanismos of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white rot fungi. In.: LEWIS, N.G.; PAICE, M.G. (Ed.). **Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers**. Washington: American Chemical Society, p. 482-502. (ACS Symposium Series, 339), 1989.

GALLAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISER, B. & HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**. 30: 529-536, 2002..

GIANFREDI, L.; XU, F.; BOLLAG, J.M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v.30, p. 1-25, 1999.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p. 454-466, 2002.

JANG, M., RYU, W., CHO, M. Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 741-746, 2002.

JOHNSON, A.R.; et al. Principles of microbial PAH degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p. 71-84, 2005.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Biosource Technology**, v.82, p. 215-217, 2002.

KIM, Y.J.; CHANG, J.H.; CHO, K.; RYU, H.W. and CHANG, Y.K. A physiological study on growth and dibenzothiophene (DBT) desulfurization characteristics of *Gordonia* sp. CYKSI. **Korean J. Chem. Eng.**, v.21, n.2, p. 436-441, 2004.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterisation of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS letters**, v.169, p. 247-250, 1984.

LIANG, Y.; SORESEN, L.D.; MCLEAN, E.J. Pyrene fate affected by humic acid in soil slurry systems. **Journal of Biological Engineering**, p. 2-11, 2008.

MISHRA, S.S.; BISARIA, V.S. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes. **Appl. Microbial Biotechnol**, v.71, p. 646-653.

O'CALLAGHAN, J.; O'BRIEN, M.M.; McCLEAN, K.; DOBSON, A.D.W. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, p.29, p. 55-59, 2002.

PAZARLIOGLU, N.K.; SARIISIK, M. & TELEFONCU, A. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. **Process Biochemistry**, v.40, p. 1673-1678, 2005..

POITING, S.B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v.92, p. 139-144, 2000.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V. & VASILCHENKO, L.G. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.1, p. 1-17, 2004.

REDDY, C.A.; SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbial Review**, v.13, p. 137-152, 1994.

ROMERO, M.C.; CAZAU, M.C.; GIORGIERI, S.; ARAMBARRI, A.M. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. **Environmental Pollution**, v.101, p. 355-359, 1998.

SZKLARZ, G.D.; ANTBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood rooting fungi. **Mycology**, v.81, p. 234-240, 1989.

TALLEY, J.W., GHOSH, U., TUCHER, S.G., FUREY, J.S. and LUTHY, R.G. Particule-scale understandin of the bioavailability of PHAs in sediment. **Environmental Science Technology**, v.36, p. 447-483, 2002.

TOUR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v.41, p. 1-17, 1995.

Terceiro Artigo:

COMPORTAMENTO ULTRAESTRUTURAL DE *Rhodotorula mucilaginosa* INDUZIDO PELA PRESENÇA DO PIRENO

Trabalho a ser submetido para a revista *Journal of Electron Microscopy*

Fator de Impacto: 1,172

COMPORTAMENTO ULTRAESTRUTURAL DE *Rhodotorula mucilaginosa* INDUZIDO PELA PRESENÇA DO PIRENO

Petrusk Homero Campos Marinho^{a,b}, Patrícia Mendes de Souza^{a,c}, Marcos Antônio Barbosa de Lima^d, Aline Elesbão do Nascimento^a, Galba Maria de Campos Takaki^{a,b,c}

^aNúcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^bPrograma de Pós - Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^cPrograma de Pós Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^dDepartamento de Biologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author. Tel: +55-81-21194017; Fax: +55-81-21194043

E-mail address: gmctakaki@pesquisador.cnpq.br (Campos-Takaki, G.M.)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a resistência / tolerância do isolado de *Rhodotorula mucilaginosa*, fungo unicelular, quanto ao seu comportamento morfológico e ultraestrutural frente à presença de Pireno, um Hidrocarboneto Aromático Policíclico (HAP). O microrganismo foi cultivado em meio de cultura Yeast Mold Broth (YMB) na ausência e presença de pireno nas concentrações de 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL. As amostras foram coletadas nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas, sob agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 28°C. Posteriormente, foram analisadas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura e transmissão, técnica de rotina e citoquímica enzimática. Os resultados obtidos revelaram diferenças na estrutura fina das amostras, quanto à forma, tamanho e eletrondensidade das células. Durante o período de crescimento da levedura, tanto na presença como na ausência de pireno, foi possível verificar a presença de blastoconídios, ovais, oblongos ou redondos, exibindo dimensões de aproximadamente 5 µm de diâmetro, apresentando-se isolados, dispostos em cadeia ou de forma irregular e com brotamentos multilaterais. Os resultados demonstram, pela primeira vez, os efeitos do pireno sobre a ultraestrutura deste fungo.

Palavras - Chave: *Rhodotorula mucilaginosa*; Pireno; Ultraestrutura.

ABSTRACT

The present study was carried out in order to evaluate the resistance / tolerance of an isolate *Rhodotorula mucilaginosa*, single-celled fungal, related to the ultrastructural behavior by the growth in pyrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). The organism was grown in Yeast Mold Broth (YMB) in the absence and presence of pyrene at concentrations of 0.25mg/mL, 0.5mg/mL and 1mg/mL, under orbital agitation of 150 rpm and 28°C. Samples were collected at 24 of cultivate. The detection of the ultrastructural alterations was performed by the use cytochemical techniques for transmission electron microscopy. The ultrastructural analysis of *Rhodotorula mucilaginosa* using the routine technique revealed alterations in the fine structure of cells, related to the presence of vacuoles, cell wall electrodensity, number of eletrondense bodies and mitochondria. Cultures treated with pyrene exhibited differences on the staining pattern when compared to control cells and pyrene concentrations. Also, the cytochrome oxidase and catalase cytochemistry showed variations in the intensity and distribution of reaction products in the cell wall, cytoplasmic membrane, cytoplasm and mitochondria related to the pyrene concentration used during cellular growth. In the experimental conditions used in this work the presence the pyrene induced different effects on *Rhodotorula mucilaginosa* ultrastructure, which are presented for the first time in the literature.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*; Pyrene; Ultrastructure.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções importantes, na manutenção de ecossistemas, como agentes biológicos fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. É importante ressaltar que os microrganismos apresentam a capacidade de degradar e acumular compostos xenobióticos, utilizando diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos [1, 2, 3]. A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada no campo da biotecnologia em pesquisas de remediação de áreas poluídas, com Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs). Esses compostos são considerados, por agências de Proteção Ambiental, poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais. O processo biotecnológico de remediação de áreas impactadas, utilizando microrganismos com potencial de degradar e metabolizar hidrocarbonetos, tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual, como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados [4, 5, 6, 7].

A literatura descreve que todos os fungos desenvolveram mecanismos para lidar com uma ampla variedade de situações de estresse. Esta extraordinária diversidade metabólica se deve a combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbianas em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos. Por outro lado, muitos fatores ambientais de natureza física, química e biológica influenciam na capacidade de um sistema microbiano em degradar moléculas recalcitrantes [2, 7, 3].

Dessa forma, os mecanismos para a resistência e tolerância a esses compostos estão diretamente ligados aos processos celulares. Como exemplo, pode-se citar estudos que demonstram que elementos e substâncias tóxicas podem induzir o surgimento de alterações morfológicas em diferentes tipos celulares. Tais modificações podem estar relacionadas a alterações na estrutura e permeabilidade da membrana plasmática, produzindo, dessa forma, progressivas alterações na morfologia e na perda da atividade metabólica [8, 9, 10, 11].

Com as técnicas de microscopia é possível aumentar o conhecimento sobre a organização espacial que ocorre nas células de microrganismos e sobre as

respectivas superfícies. A microscopia eletrônica de varredura permite a visualização das estruturas complexas da superfície das células com elevada resolução. O objetivo deste estudo foi analisar alterações ultraestruturais induzidas pelo pireno em *Rhodotorula mucilaginosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Foi utilizada *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1003, gentilmente cedida pelo Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife - PE, Brasil; cadastrada no WFCC (*World Federation Culture Collection*). O microrganismo foi mantido no meio Yeast Mold Agar (YMA), sob refrigeração, à temperatura de 4°C. Paralelamente, repiques sucessivos foram realizados a cada 30 dias para manter a viabilidade.

2.2. Substrato

O Hidrocarboneto Aromático Policíclico (HAP) utilizado neste experimento foi o Pireno (SIGMA). O hidrocarboneto foi solubilizado em acetona a 70%.

2.3. Meios de Cultura

2.3.1. Meio de Manutenção

Para manutenção foi utilizado o meio Yeast Mold Agar (YMA) descrito por CIRIGLIANO & CARMAN [12], constituído dos seguintes nutrientes: Extrato de Levedura - 0,3 %; Extrato de Malte - 0,3 %; Peptona 0,5 %; D - Glicose - 1,0 % e Agar - 1,5 %. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com uma solução de NaOH 1M ou HCl 1M.

2.3.2. Meio de Crescimento

Foi utilizado o meio Yeast Mold Broth (YMB), também descrito por CIRIGLIANO & CARMAN [12], contendo os mesmos nutrientes que o meio YMA, com a exceção do ágar.

2.4. Métodos Microbiológicos

2.4.1. Pré - Inóculo

Rhodotorula mucilaginosa foi cultivada no meio Yeast Mold Agar (YMA), à temperatura de 28°C, durante 24 horas. Alçadas de culturas de *Rhodotorula mucilaginosa* foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de capacidade de 500mL, contendo 250mL de meio Yeast Mold Broth (YMB) e incubadas por 24 horas, sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 28°C, até a obtenção de 10^7 células / mL, servindo de pré-inóculo para a etapa seguinte.

2.4.2. Condições de Cultivo - Tratamento com Pireno

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio YMB adicionado de 0, 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL, inoculados com 6% (alíquotas de 15 mL do pré-inóculo) da suspensão celular de 10^7 células / mL e incubadas por 72 horas, à temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm. As amostras foram coletadas durante o período de cultivo nos intervalos de 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) e Transmissão (MET).

2.5. Estudo Ultraestrutural [13]

A análise ultraestrutural de *Rhodotorula mucilaginosa*, das culturas controle e tratadas com pireno foram obtidas através da utilização da microscopia eletrônica de transmissão, com uso de cortes ultrafinos e aplicação de duas técnicas citoquímicas. Paralelamente, as amostras de *Rhodotorula mucilaginosa* foram submetidas à análise ultraestrutural utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

2.5.1. Técnica de Rotina

A amostra de *Rhodotorula mucilaginosa* coletada durante o intervalo de 24 horas de crescimento, em meio YMB, em presença e ausência de pireno foram lavadas em PBS (Tampão Fosfato Salina), pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida foram fixadas em Glutaraldeído 2,5%, em Tampão Fosfato 0,1M, pH 7,4, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Finda a etapa de fixação, a amostra foi lavada novamente com Tampão Fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Seguiu-se a pós-fixação, com Tetróxido de Ósmio 1%, em Tampão Fosfato 0,1M, durante 1 hora à temperatura ambiente, em condições de escuridão. Em seguida a amostra foi lavada com Tampão Fosfato 0,1M, sendo posteriormente submetidas ao processo de desidratação.

Para a desidratação foi utilizada acetona em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% (três vezes, 10 minutos para cada troca) até a concentração absoluta de 100% (três vezes, 30 minutos para cada troca). O procedimento seguinte foi a embebição com misturas de acetona e resina epóxi, nas concentrações de 2:1, 1:1, 1:2 (1 hora em cada etapa) e finalmente resina epóxi pura durante 12 horas. O emblocamento foi realizado com resina epóxi, sendo o endurecimento total da resina obtido pela incubação em estufa à temperatura de 60°C, durante 72 horas.

Após a obtenção dos blocos, os mesmos foram destinados a ultramicrotomia (realizada com o micrótomo REICHERT JUNG) para obtenção de cortes ultrafinos, os quais foram postos em grades. As grades foram destinadas à observação ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL CX 100 (operando a 80 Kv) e as eletronicografias foram então obtidas e analisadas.

Paralelamente, as amostras foram submetidas ao estudo ultraestrutural, utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Ao invés de acetona para desidratação foi utilizado etanol em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% (três vezes, 10 minutos para cada troca) até a concentração absoluta de 100% (três vezes, 30 minutos para cada troca). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico para a eliminação total da fase líquida, montada em suporte de alumínio e metalizada com ouro. Assim preparada, as amostras foram analisadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL LSM 5600.

2.5.2. Citoquímica para Citocromo Oxidase [14]

Uma suspensão das culturas, controle e tratadas, obtidas no intervalo de 24 horas foram lavadas em solução Tampão Salina Fosfato, pH 7,0, por três vezes, durante 10 minutos e centrifugada a 2000 rpm, durante 15 minutos. As amostras foram fixadas em uma solução de Glutaraldeído 2,5%, em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse intervalo, as amostras foram lavadas em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2 e Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,6, contendo 5% de sacarose.

Realizada esta etapa, as amostras foram incubadas em meio contendo 5 mg de diaminobenzidina (DAB) em 10 mL de Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,6. A incubação foi realizada durante 60 minutos, à temperatura de 37°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas duas vezes em Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,6, contendo 5% de sacarose e em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose.

A pós-fixação foi obtida através da utilização do Tetróxido de Ósmio 1% em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 1 hora à temperatura ambiente e em condições de escuridão. Finda esta etapa as amostras foram lavadas, três vezes, em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 10 minutos. A seguir as amostras foram desidratadas em acetona em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% (três vezes, 10 minutos para cada troca) até a concentração absoluta de 100% (três vezes, 30 minutos para cada troca). O procedimento seguinte foi a embebição com misturas de acetona e resina epóxi, nas concentrações de 2:1, 1:1, 1:2 (1 hora em cada etapa) e finalmente resina epóxi pura durante 12 horas. O emblocamento foi realizado com resina epóxi, sendo o endurecimento total da resina obtido pela incubação em estufa à temperatura de 60°C, durante 72 horas.

Após a obtenção dos blocos, os mesmos foram destinados a ultramicrotomia (realizada com o micrótomo REICHERT JUNG) para obtenção de cortes ultrafinos, os quais foram postos em grades. As grades foram destinadas à observação ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL CX 100 (operando a 80 Kv) e as eletronicografias foram então obtidas e analisadas.

2.5.3. Citoquímica para Catalase [15]

Uma suspensão das culturas, controle e tratadas, obtidas no intervalo de 24 horas foram lavadas em solução Tampão Salina Fosfato, pH 7,0, por três vezes, durante 10 minutos e centrifugada a 2000 rpm, durante 15 minutos. As amostras foram fixadas em uma solução de Glutaraldeído 2,5%, em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse intervalo, as amostras foram lavadas em Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 9,0, contendo 5% de sacarose.

Realizada esta etapa, as amostras foram incubadas em meio contendo 20 mg de diaminobenzidina (DAB) em 10 mL de Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 9,0. A incubação foi realizada durante 60 minutos, à temperatura de 37°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas duas vezes em Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 9,0, contendo 5% de sacarose. Finda esta etapa, as amostras foram incubadas em 20 mg de diaminobenzidina (DAB) em 9,8 mL de Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 9,0 e 0,2 mL de H₂O₂ 1%. A incubação foi realizada durante 4 horas, à temperatura de 37°C. As amostras foram lavadas em Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 9,0 e em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose.

A pós-fixação foi obtida através da utilização do Tetróxido de Ósmio 1% em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 1 hora à temperatura ambiente e em condições de escuridão. Finda esta etapa as amostras foram lavadas, três vezes, em Tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 10 minutos. A seguir as amostras foram desidratadas em acetona em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% (três vezes, 10 minutos para cada troca) até a concentração absoluta de 100% (três vezes, 30 minutos para cada troca). O procedimento seguinte foi a embebição com misturas de acetona e resina epóxi, nas concentrações de 2:1, 1:1, 1:2 (1 hora em cada etapa) e finalmente resina epóxi pura durante 12 horas. O emblocamento foi realizado com resina epóxi, sendo o endurecimento total da resina obtido pela incubação em estufa à temperatura de 60°C, durante 72 horas.

Após a obtenção dos blocos, os mesmos foram destinados a ultramicrotomia (realizada com o micrótomo REICHERT JUNG) para obtenção de cortes ultrafinos,

os quais foram postos em grades. As grades foram destinadas à observação ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL CX 100 (operando a 80 Kv) e as eletronicografias foram então obtidas e analisadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo Ultraestrutural

As leveduras servem como organismos modelo para uma série de mecanismos e processos celulares, devido ao fato de serem os microrganismos eucarióticos mais facilmente manipulados. Porém, poucas informações sobre a resistência / tolerância de leveduras frente à presença de xenobióticos têm sido publicadas. Entre estes, estudos acerca da morfogênese e ultraestrutura são fundamentais.

O estudo ultraestrutural realizado neste trabalho teve como objetivo básico observar se o pireno poderia induzir alguma alteração nas células de *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando-se para tal, duas técnicas citoquímicas, específicas para citocromo oxidase e catalase, diretamente relacionadas com o metabolismo celular.

Considerando os resultados obtidos para o crescimento celular frente à presença e ausência do hidrocarboneto, foram selecionados os tratamentos realizados com 24 horas de cultivo, fase exponencial de crescimento, e as amostras com as concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. O estudo ultraestrutural foi realizado para verificar os possíveis efeitos do pireno sobre a estrutura fina de *Rhodotorula mucilaginosa*, com uso da técnica de rotina. Através das micrografias obtidas foi possível verificar diferenças na eletrondensidade celular e profundidade das invaginações existentes na membrana plasmática das amostras controle e tratadas. Nota-se também que o citoplasma se apresenta vacuolizado (Figuras 1A-D). A parede celular dessas células apresenta um espaço de baixa eletrondensidade embora, a superfície externa da parede esteja pouco mais eletrondensa. Pode-se observar citoplasma homogeneamente granular, presença de núcleo e mitocôndrias.

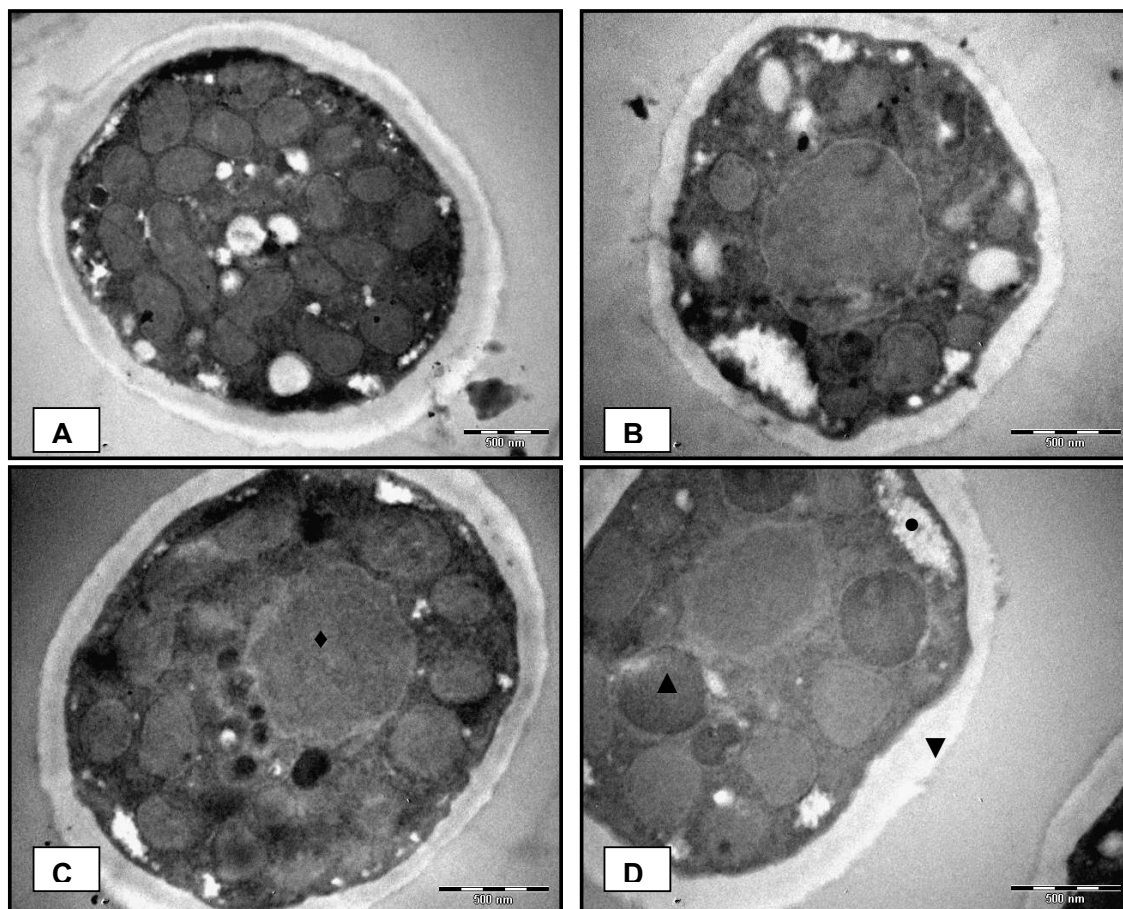


Figura 1. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, Técnica de Rotina. A (Controle); B (0,25 mg/mL); C (0,5 mg/mL) e D (1 mg/mL). Parede Celar (▼); Membrana Citoplasmática (►); Vacúolos (●); Núcleo (◆); Corpos Eletrondensos (▲)

As figuras 2A, 2B, 2C e 2D exibem amostras das culturas controle e tratadas com pireno submetidas a citoquímica enzimática para citocromo oxidase. Nas micrografias é possível observar a presença de organelas típicas de células eucarióticas, como mitocôndrias, vacúolos e de uma membrana citoplasmática intensamente invaginada. A parede celular mostra-se constituída de três camadas básicas que exibem eletrondensidades diferentes e uma forte marcação é observada

nas cristas das mitocôndrias de forma distinta em relação às amostras controle e tratadas. Células submetidas ao cultivo em presença de 0,5 mg/ mL de pireno apresentaram diferenças mais evidentes.

As análises das micrografias permitem perceber que embora, ocorra maior deposição de produtos de reação sobre a superfície das membranas internas das mitocôndrias, a densidade de marcação nas amostras tratadas é bem menor que àquela observada quanto à amostra controle. Mitocôndrias observadas são bem maiores em relação à amostra controle. Nessas amostras percebe-se a presença de inclusões com alta eletrondensidade.

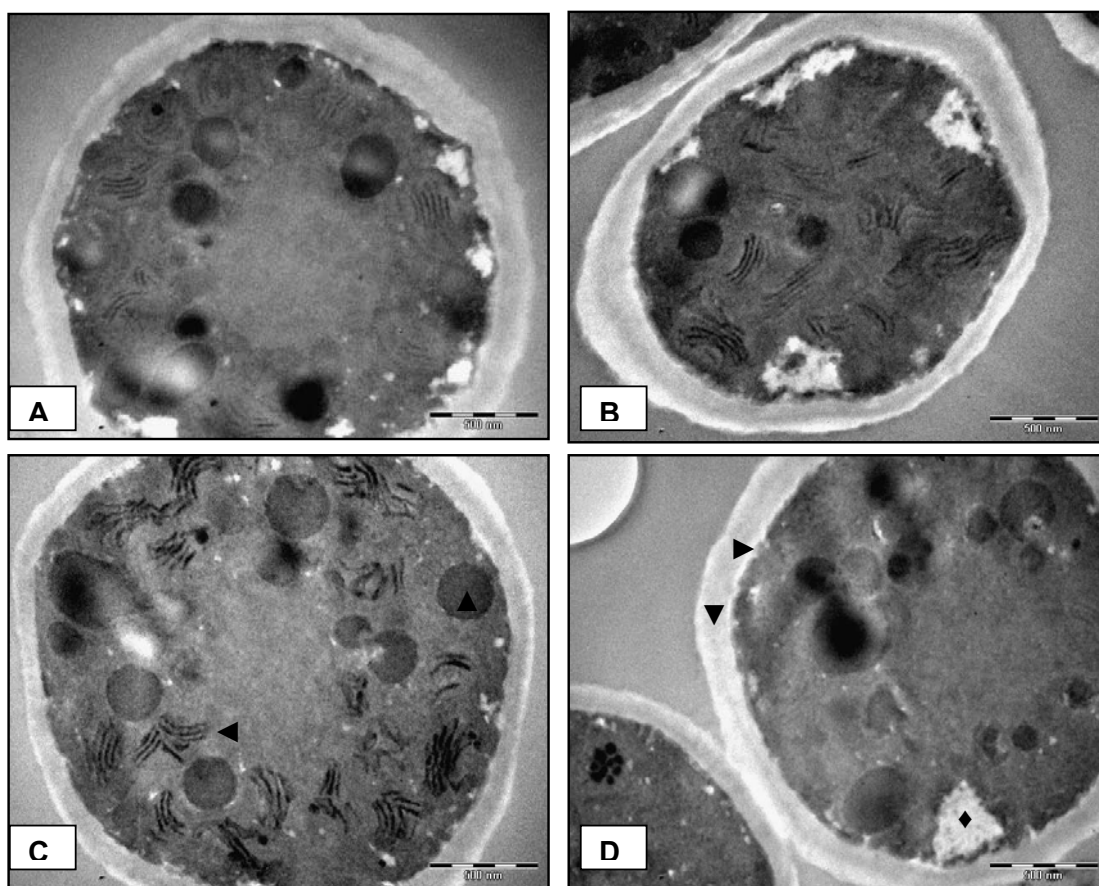


Figura 2. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, Citoquímica Enzimática para Citocromo Oxidase. A (Controle); B (0,25 mg/mL); C (0,5 mg/mL) e D

(1 mg/mL). Parede Celular (▼); Membrana Citoplasmática (►); Vacúolos (●); Núcleo (◆); Corpos Eletrondensos (▲); Mitocôndrias (◄)

Amostras das culturas controle e tratadas submetidas a citoquímica enzimática para catalase estão apresentadas nas figuras 3A, 3B, 3C e 3D. Nessas células observa-se a presença de alterações na eletrondensidade das mitocôndrias e dos peroxissomos, os quais exibem grande densidade dos produtos de reação. Nas micrografias é possível observar a presença de vacúolos e invaginações da membrana citoplasmática.

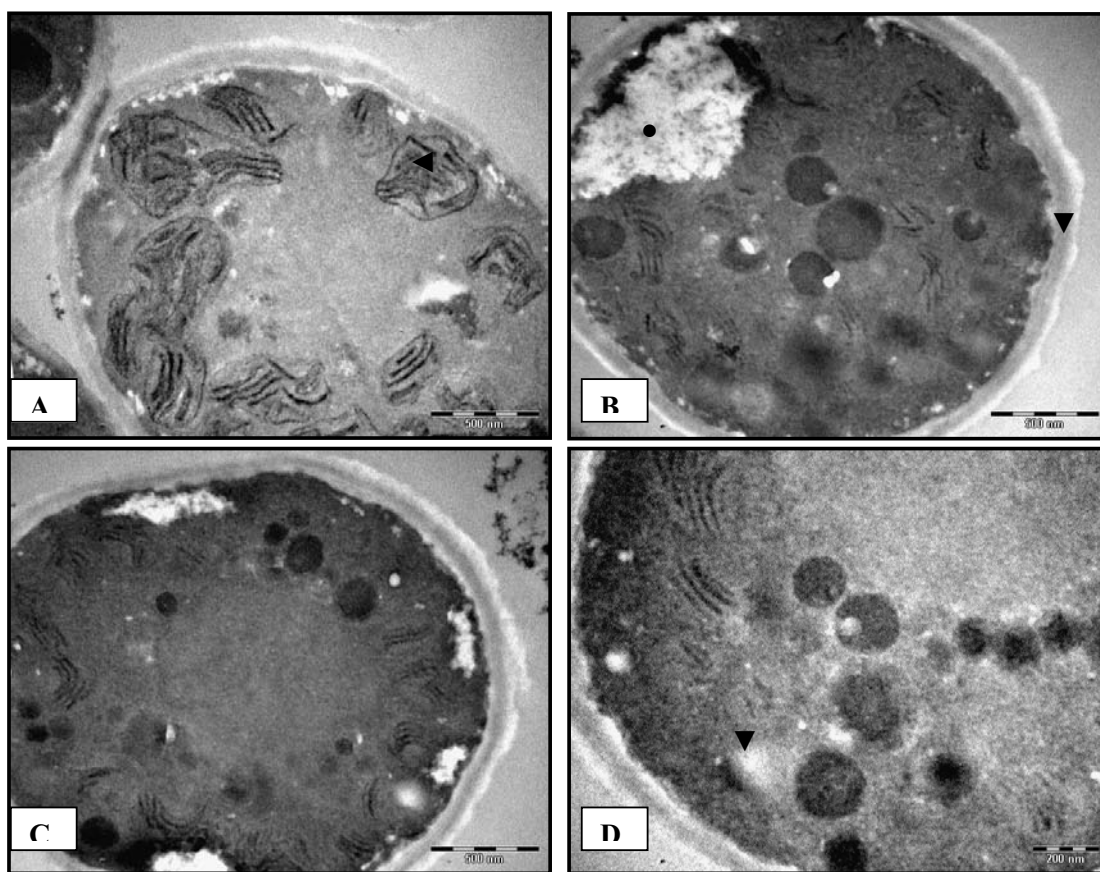


Figura 3. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, Citoquímica Enzimática para Catalase. A (Controle); B (0,25 mg/mL); C (0,5 mg/mL) e D (1 mg/mL). Parede Celular (▼); Membrana Citoplasmática (►); Vacúolos (●); Núcleo (◆); Corpos Eletrondensos (▲); Mitocôndrias (◄)

Considerando a importância da influência das condições ambientais sobre os microrganismos, este trabalho demonstrou que uma substância como o pireno é capaz de influenciar, de acordo com a sua concentração à cultura, não apenas o crescimento e a liberação de exoenzimas em *Rhodotorula* mucilaginosa, mas que também induz o surgimento de alterações ultraestruturais, relativas à organização e distribuição de produtos de marcação citoquímica.

Os mecanismos de ação desse tipo de substância devem ser averiguados e estudados mais profundamente. Além disso, a natureza dos componentes alterados deve ser avaliada bioquimicamente e uma análise do comportamento do metabolismo celular em presença de pireno deve ser realizada.

Nas eletromicrografias obtidas da cultura controle Figura 4 (A e A1) e tratadas (B, B1, C, C1, D e D1) nos intervalos de 8 horas e 12 horas de crescimento, observam-se células marcadamente eletrondensas, com superfícies homogêneas, e a presença de cicatrizes deixadas pela liberação das células filhas (brotos), bem como um grande número de células em fase de crescimento. Em ambas as amostras, controle e tratadas, observa-se a presença de variações relativas à forma e tamanho celulares dos blastoconídios. Blastoconídios ovais e elipsóides, também, foram observados, com dimensões variando entre 2 μ m a 5 μ m de diâmetro. Brotos foram visualizados, permanecendo ligados a célula-mãe, formando cadeias e arranjos irregulares.

Por outro lado, as preparações obtidas de culturas de *Rhodotorula mucilaginosa* com 16 horas e 20 horas de crescimento, para as amostras controle Figura 5 (A e A1) e tratadas (B, B1, C, C1, D e D1) com pireno nas concentrações de 0,25 mg / mL, 0,5 mg / mL e 1 mg / mL revelaram células com aspectos distintos daquelas das amostras controle. De uma forma geral, as culturas de *Rhodotorula mucilaginosa* tratadas com pireno, no início da fase exponencial de crescimento nos intervalos de 8, 12, 16 e 20 horas, apresentaram alterações ultraestruturais. A amostra tratada com 1 mg / mL de pireno apresentou células menos desenvolvidas em relação as outras amostras. A Figura 6 apresenta os resultados obtidos para as culturas de *Rhodotorula mucilaginosa* controle (A e A1) e tratadas (B, B1, C, C1, D e D1) com pireno nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL após 24 e

48 horas de crescimento. Pode-se observar a presença das alterações já citadas, como a presença de blastoconídios, ovais, oblongos ou redondos, exibindo dimensões de aproximadamente 5 μ m de diâmetro e apresentando-se isolados, dispostos em cadeia ou de forma irregular e, exibindo brotamentos multilaterais.

As células de culturas de *Rhodotorula mucilaginosa* tratadas com pireno nas diferentes concentrações, após 24 e 48 horas de crescimento, mostraram-se diferentes daquelas do controle, tanto em 24 horas como para 48 horas de cultivo. Paralelamente, as preparações obtidas de culturas de células de *Rhodotorula mucilaginosa* Figura 7 com 72 horas de crescimento, para as amostras controle (A) e tratadas (B, C e D) exibiram células menos desenvolvidas do que no início da fase exponencial de crescimento.

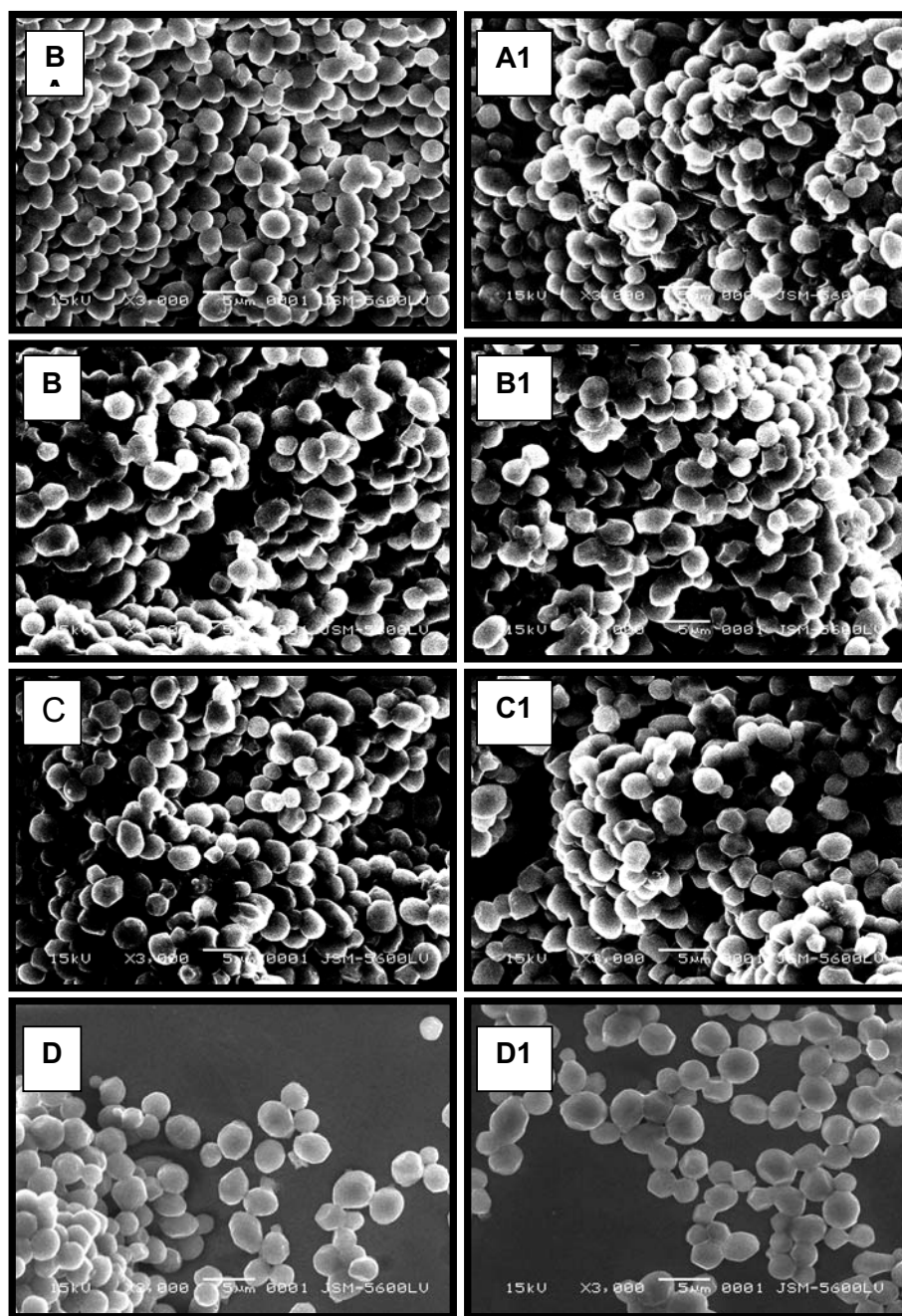


Figura 4. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A e A1), 0,25 mg / mL (B e B1); 0,5 mg / mL (C e C1) e 1,0 mg / mL (D e D1). Incubados à 28°C, no período de 8 e 12 horas, respectivamente. Aumento de 3000X. Blastocónídios (•); Células-filhas (Brotos) (♦).

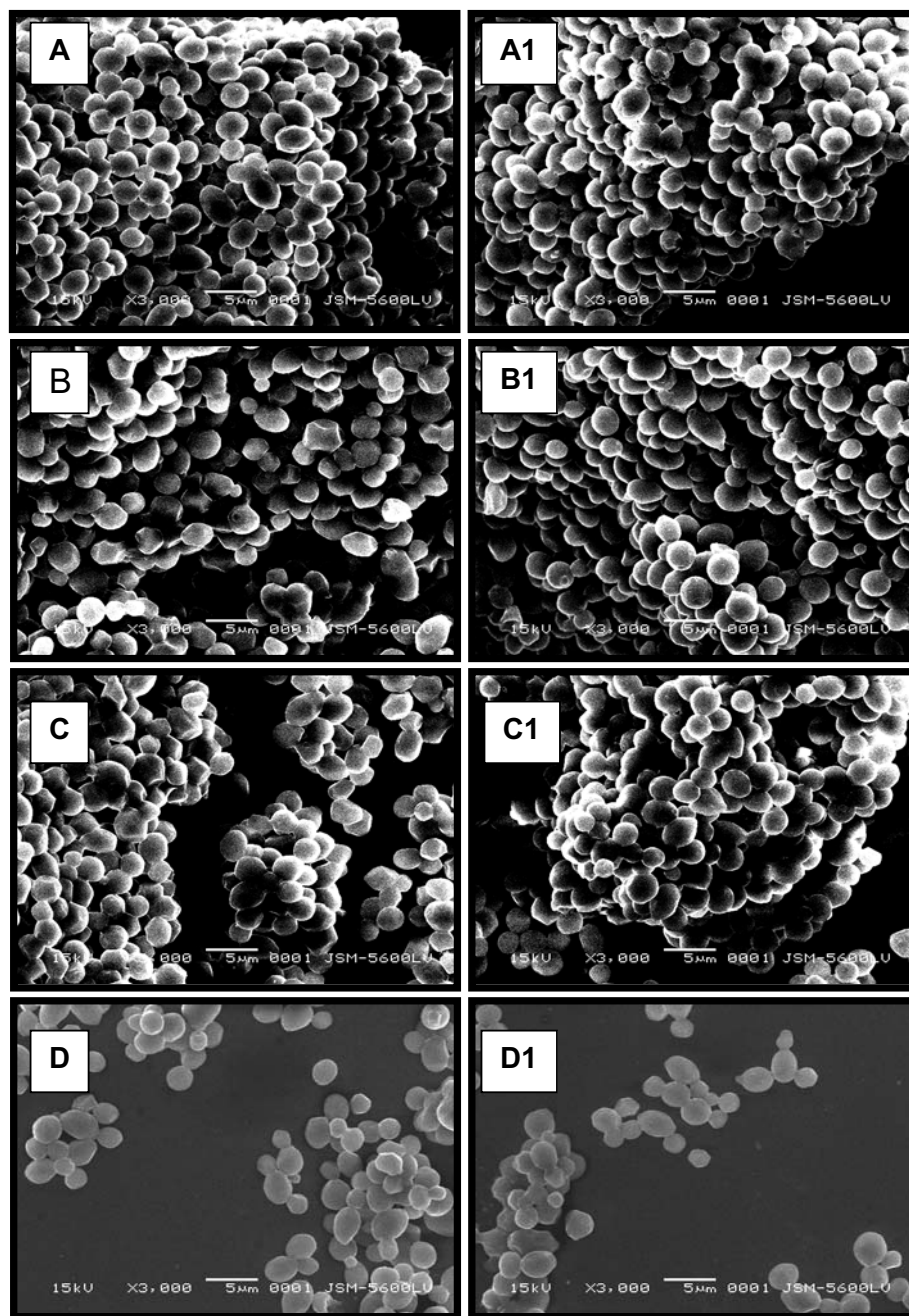


Figura 5. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A e A1), 0,25 mg / mL (B e B1); 0,5 mg / mL (C e C1) e 1,0 mg / mL (D e D1). Incubados à 28°C, no período de 16 e 20 horas, respectivamente. Aumento de 3000X. Blastocônídios (●); Células-filhas (Brotos) (◆).

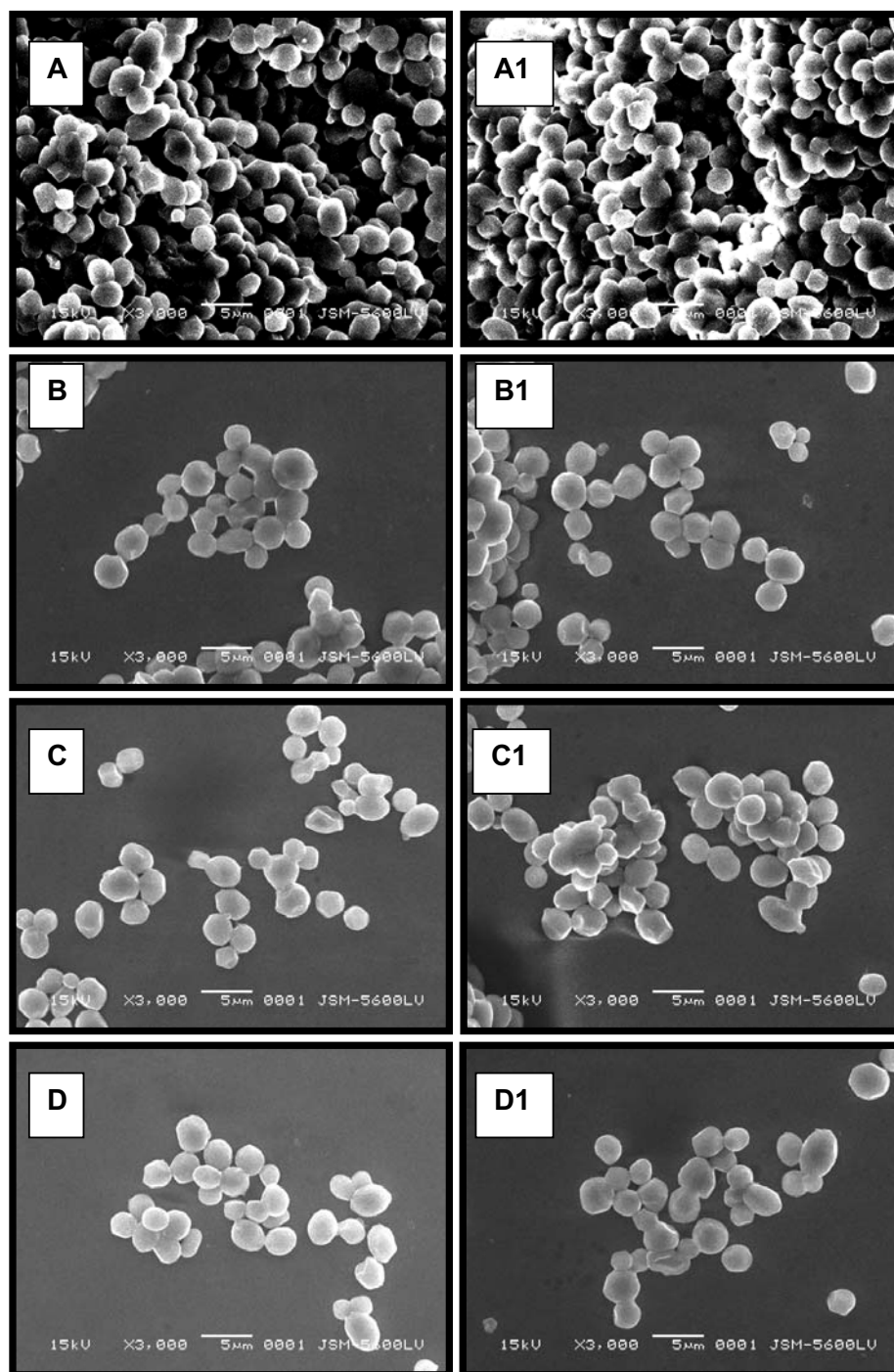


Figura 6. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A e A1), 0,25 mg / mL (B e B1); 0,5 mg / mL (C e C1) e 1,0 mg / mL (D e D1). Incubados à 28°C, no período de 24 e 48 horas, respectivamente. Aumento de 3000X. Blastoconídios (●); Células-filhas (Brotos) (♦).

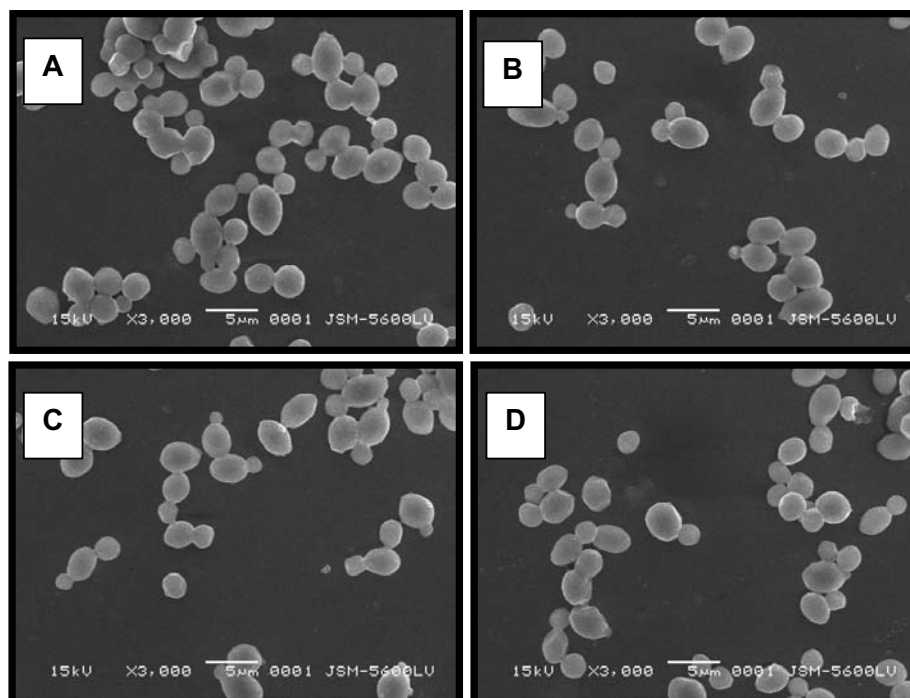


Figura 7. Eletromicrografias de amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*. Controle (A); 0,25 mg / mL (B); 0,5 mg / mL (C) e 1,0 mg / mL (D). Incubados à 28°C, no período de 72 horas. Aumento de 3000X. Blastoconídios (●); Células-filhas (Brotos) (◆).

A dinâmica de qualquer processo envolve grande gama de fatores, a variação das condições físico-químicas do meio em que está inserido o microrganismo, pode ocasionar mudanças em sua morfologia e ultraestrutura. As mudanças se referem ao tamanho das células ou à sua forma, resultando, em alguns casos, em um completo dimorfismo. As alterações podem ocorrer nas organelas, nas membranas e na parede celular. O aumento ou diminuição de substâncias de reserva, de enzimas e de outros componentes químicos são outras alterações freqüentes [8, 9, 10, 11, 16].

Os microrganismos e principalmente os fungos apresentam extraordinária versatilidade metabólica que se deve à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbianas em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos. Essas características

permitiram o seu desenvolvimento em condições ambientais adversas e faz dos fungos importantes agentes na remediação de ecossistemas contaminados com xenobióticos [17].

Sabe-se que o processo de crescimento e diferenciação celulares está intimamente associado a modificações químicas e estruturais na organização da célula, as quais funcionam como marcadores para os diferentes estágios de maturação de um organismo. Inúmeros fatores influenciam a morfologia e ultraestrutura de microrganismos. Variações na composição química em função da composição do meio, a idade celular, e estágio metabólico resultam, por exemplo, em modificações na morfologia e estrutura fina dos fungos [18, 17].

Os efeitos debilitantes do estresse físico e químico que sofrem as células microbianas estão bem documentados, bioquimicamente e molecularmente, sugerindo que as células alteradas, mais viáveis foram modificadas fisiologicamente. O estudo à resposta ao estresse oxidativo é essencial para o entendimento da fisiologia celular em função de estímulos ambientais, resultando em um mecanismo de defesa fundamental na presença de substâncias xenobióticas. Embora os mecanismos de adaptação de microrganismos a ambientes submetidos a alto estresse oxidativo não estejam totalmente elucidados, postula-se que enzimas como citocromo oxidase e catalase possam estar envolvidas na eliminação da toxicidade de inúmeras substâncias tóxicas [19].

A introdução da microscopia eletrônica como ferramenta para a análise da estrutura fina de inúmeros tipos celulares, sem dúvida, trouxe uma melhor compreensão do comportamento celular em função da composição química e física do ambiente.

A citoquímica ultraestrutural gera informações sobre a localização *in situ* de moléculas, permitindo a associação entre as diferentes atividades bioquímicas de qualquer tipo celular. Os resultados obtidos com a citoquímica combinados com dados obtidos por outras metodologias conduzem a elucidação das funções, atividades e estado metabólico de diferentes compartimentos celulares. [20].

As proteínas constituem uma importante classe entre os componentes químicos presentes na célula por desempenhar uma série de funções essenciais, entre as quais constituir o principal elemento estrutural, enzimas e encontrar-se

associado a outros elementos importantes tais como lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos. A sua identificação e precisa localização permite que se conheça melhor os mecanismos e função de determinado tipo e/ou estrutura celular. Desse modo, atualmente a citoquímica tem auxiliado a identificação das proteínas por meio de tratamentos citoquímicos [20].

Efeitos relacionados à presença de pireno sobre a estrutura celular de fungos são inexistentes. O emprego do método de rotina para microscopia eletrônica de transmissão permitiu verificar variações na estrutura fina de *Rhodotorula mucilaginosa* em função do cultivo em presença de diferentes concentrações de pireno. Variações relativas à eletrondensidade de parede celular, presença de mitocôndrias, corpos eletrondensos, estrutura de citoplasma, vacuolização foram observadas neste estudo, demonstrando pela primeira vez tal comportamento nesta levedura.

Nascimento et al. [21] analisaram o efeito do Tween 80 em diferentes concentrações sobre a ultraestrutura de *Candida lipolytica* e verificaram que o surfactante sintético induziu variações na distribuição de polímeros da superfície celular, ocorrendo variação no padrão de marcação da superfície celular como resposta à presença do surfactante. Além disso, foram observadas variações relativas a eletrondensidade de parede celular, corpos eletrondensos, mitocôndrias e vacuolização.

A citocromo oxidase e as catalases são enzimas oxidativas normalmente encontradas em mitocôndrias e peroxissomos. Embora não seja essencial para o crescimento e a sobrevivência de microrganismos sob condições laboratoriais, tais enzimas são fundamentais para a sobrevivência em inúmeras situações de estresse ambiental. As células sintetizam a catalase em resposta a diferentes condições ambientais e normalmente estão situadas no citoplasma, podendo ser visualizadas na superfície celular. Na região superficial, local comum para a superóxido dismutase, ambas as enzimas inibem o acesso de espécies reativas de oxigênio a componentes sensíveis da membrana celular e citoplasma, podendo atuar efetivamente nos processos alternativos de reparo celular [22].

Para determinar um possível mecanismo de adaptação ao estresse induzido pelo pireno em *Rhodotorula mucilaginosa* foram analisados o efeito desse

xenobiotico sobre a ultraestrutura, em presença de diferentes concentrações, numa tentativa de elucidar a distribuição, bem como a localização das enzimas citocromo oxidase e catalase na célula. As células sintetizam as enzimas catalase e citocromo oxidase como resposta ao estresse oxidativo. A produção dessas enzimas está diretamente relacionada com variações bruscas de pH, toxicidade do meio e *starvation* [23].

De uma forma geral, as células de *Rhodotorula mucilaginosa* cresceram em presença do pireno, nas diferentes concentrações testadas, podendo-se observar, em relação às condições adversas que lhes foram impostas, alterações relacionadas, à forma e tamanho. Durante o crescimento da levedura foi possível verificar a presença de blastoconídios, com dimensões de aproximadamente 5 µm, dispostos de forma irregular e, também, a presença de brotamentos multilaterais, reproduzindo-se e formando cadeias. A presença de pseudomicélios não foi evidenciada.

Microrganismos adaptados a ambientes poluídos por resíduos industriais e solventes orgânicos têm sido caracterizados. Esses microrganismos e sua ação em processos que alteram o ambiente, tais como degradação de substâncias tóxicas e oxidação de metais pesados têm sido relatados e estudados ao microscópio eletrônico [24, 25, 26].

Essa capacidade que as leveduras têm para crescer em condições adversas, apresentando mecanismos de adaptação e de tolerância a fatores ambientais faz destes organismos excelentes modelos experimentais para estudos relacionados à degradação de xenobióticos [27, 28].

Assim sendo, estudos associando a resposta ultraestrutural, citoquímica enzimática, em fungos são escassos. Análises mais sistematizadas devem ser realizadas para ampliar o conhecimento acerca das respostas ao nível celular de sistemas biológicos para remediação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. Desse modo, o presente trabalho é o primeiro a relatar os efeitos do pireno sobre a estrutura fina de *Rhodotorula mucilaginosa*.

4. CONCLUSÕES

A análise ultraestrutural de *Rhodotorula mucilaginosa* cultivado em presença de pireno nas três concentrações testadas, utilizando-se os métodos de rotina e citoquímica enzimática, para citocromo oxidase e catalase foram realizados, utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão. A partir dos resultados obtidos com a técnica de rotina foi possível verificar alterações na estrutura fina das células, relacionadas a presença de vacúolos, eletrondensidade de parede celular, número de corpos eletrondensos e mitocôndrias. A citoquímica enzimática para citocromo oxidase e catalase mostraram variações relacionadas à intensidade e distribuição dos produtos de reação na parede celular, na membrana citoplasmática, no citoplasma e nas mitocôndrias. Pelo método de rotina, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar e evidenciar diferenças na estrutura fina das amostras de *Rhodotorula mucilaginosa*, em relação aos aspectos morfológicos, presença de blastoconídios, organização das leveduras e eletrondensidade das células, em presença e ausência do hidrocarboneto.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à CAPES pela Bolsa de Doutorado concedida ao primeiro autor, à Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pelo apoio e ao CNPq, FINEP, PRONEX pelo suporte técnico e financeiro na execução deste trabalho.

5. REFERÊNCIAS

- [1] HEDLUND, B.P.; GEISELBRECHT, A.D. & STALEY, J.T (2001). *Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas* like naphtalene dioxygenase. FEMS Microbiology Letter, v.201, p. 47-51.
- [2] HWANG, S. & CUTRIGHT, T.J. (2002). Biodegradability of aged pyrene and phenantrene in a natural soil. Chemosphere, v.47, p. 891-899.

- [3] CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. & OUDOT, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, v.155, p. 587-595.
- [4] WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data, 32. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. pp. 447, 1983.
- [5] NETO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F. & BAREK, J. A. (2000). Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica, *Química Nova*, v.23, n.6, p. 765-773.
- [6] YUNKER, M.B.; MACDONALD, R.W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, H.; GOYETTE, D. & SILVESTRE, S. (2002). PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, v.33, p. 489-515.
- [7] SISINNO, C.L.S.; NETTO, A.D.P.; REGO, E.C.P. & LIMA, G.S. (2003). Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Caderno de Saúde Pública*, v.19, n.2, p. 671-676.
- [8] FUHRMANN, S.; OVERMANN, J.; PFENNIG, N.; FISCHER, U. (1993). Influence of vitamin B12 and light on the formation of chlorosomes in green and brown colored *Chlorobium* species. *Archives of Microbiology*, Berlin, v.160, p. 193-198.
- [9] WARTMANN, T.; KRUGER, A.; ADLER, K.; DUC, B.M.; KUNZE, I. (1995). Temperature dependent dimorphism of the yeast *Arxula adenivorans* Ls3. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.8, n.3, p. 215-223.

- [10] TURNAU, K.; DEXHEIMER, J. (1995). Acid phosphatase activity in *Pisolithus arhizus* mycelium treated with cadmium dust. *Mycorrhiza*, v.5, n.3, p. 205-211.
- [11] SURMAN, S.B.; WALKER, J.T.; GODDARD, D.T.; MORTON, L.H.G.; KEEVIL, C.W.; WEAVER, W.; SKINNER, A.; HASON, K.; CALDWELL, D.; KURTZ, J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J. Microbiol. Methods*, v.25, p. 57-70.
- [12] CIRIGLIANO, M. C. & CARMAN, G. M. (1983). A plating technique for the selective isolation of yeast utilizing water miscible carbon. *J. Food Scienc*, 48, 1554-1555.
- [13] DE SOUZA, W. (2000). Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, p. 271.
- [14] ANGERMULLER, S & FAHIMI, D. (1982). Citocrome-buffered osmium tetroxide an excellent stain visualization of citocrome in transmission electron microscopy. *Histochem. J*, 14, 823-835.
- [15] ROBINSON, J. M. & KAMOOVSKI, M. J. (1980). Evaluation of the Polyene Antibiotic Filipin as a Cytochemical probe for membrane cholesterol. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 161-168.
- [16] RAJAPAKSHA, R.M.C.P; TOBOR-KAPLON, M.A. & BAATH, E. (2004). Metal toxicity affects and bacterial active in soil differently. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2966-2973.
- [17] LOURENÇO, L. B; FELISBINO, S. L. (2001). Peroxisomes. In: Carvalho, H F E Recco- Pimentel S M (orgs). *A célula 2001*. Ed Manole, Barueri, Brasil, 72-180.
- [18] SARASWATHY, A; HALLBERG, R. (2000). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbio Lett*, 210, 227-232.

- [19] LOWEN, P. C. (1997). Bacterial catalases oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 273-308.
- [20] KLOPARENS, K. L. (1990). The development and application of ultrastructural research in Mycology. *Mycopathologia*, 109, 139-148.
- [21] NASCIMENTO, A. E., SHARI'A, A. E. N., LIMA, M. A.B., CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2000). A Cytochemical study of acid carbohydrates on the surface of *Candida lipolytica* grown in the 80 containing medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 30-36.
- [22] SCANDALIOS, J. G., GUAN, L., POLIDOROS, A.N. (1997). Catalase in Plants: gene structure, properties, regulation and expression, p. 343-406. In: J G Scandalios (ed), *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- [23] ZHANG, D., FREEMAN, J.P., SUTHERLAND, J.B., WALKER, A. E., YANG, Y., CERNIGLIA, C.E. (1996). Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 798-803.
- [24] MARCELINO, N., GUIOT, S.R., COSTERTON, J.W. (1992). Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3448-3454.
- [25] COUTINHO, C.M.L.M.; MAGALHÃES, F.C.; ARAÚJO JORGE, T.C. Ultrastructure of the sulphidogenic biofilms rich in sulphate reducing bacteria causing corrosion in the offshore oil extraction platforms off Brazil Atlantic coast. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tokyo, v.40, n.3, p. 227-241, 1994.
- [26] RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; HUERTAS, M.J.; HAIDOUR, A. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in

the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.177, n.14, p. 3911-3916, 1995.

[27] SANTORO, N.; THIELE, D.J. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Stress Response*. Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 1997

[28] COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med*, v.22, p. 217-246, 2001.