UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE *Cunninghamella elegans* CULTIVADA EM MEIO CONTENDO NAFTALENO

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

RECIFE – 2004

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE *Cunninghamella elegans* CULTIVADA EM MEIO CONTENDO NAFTALENO

RECIFE - 2004

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE *Cunninghamella elegans* CULTIVADA EM MEIO CONTENDO NAFTALENO

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

ORIENTADORA: PROFª. DRª. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI

CO-ORIENTADORA: PROFª. DRª. ALINE ELESBÃO DO NASCIMENTO

RECIFE - 2004

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE *Cunninghamella elegans* CULTIVADA EM MEIO CONTENDO NAFTALENO

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

Dissertação defendida em 19/02/04 e aprovada pela banca examinadora:

ORIENTADOR: _____
Profª. Drª. Galba Maria de Campos Takaki

EXAMINADORES: _____
Profª. Drª. Kaoru Okada

_____
Profª. Drª. Maria Aparecida Resende

SUPLENTES: _____
Profª. Drª. Norma Buarque de Gusmão

_____
Profª. Drª. Neiva Tinti

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro Marinho e Kátia Natércia, pelo Amor Incondicional.

À minha irmã Kaline e aos meus sobrinhos Luan e Pedro, pelo mesmo sentimento que nos move - A Virtude por Excelência e único Nome que pode substituir Deus - Amor.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho;

À Profª. Drª. Aline Elesbão do Nascimento, pela co-orientação, atenção e amizade, e por ter me ajudado em todos os momentos em que precisei;

Aos colegas de trabalho Marcos Lima e Patrícia Mendes, pela amizade e colaboração, no transcorrer deste trabalho, e por todos os momentos em que convivemos;

À Ricardo Kenji, pela amizade de longa data, e por ter me ajudado nos experimentos de CCD e HPLC;

À Raquel Diniz, pelo amor e carinho, durante todo esse tempo em que convivemos juntos;

À Francisco Santiago, por ter me presenteado com um computador, o qual pude escrever a minha dissertação;

Ao Sr. Rufino, pelo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho;

Aos meus colegas do Mestrado em Biologia de Fungos, pelos momentos gratificantes;

Aos professores do Mestrado em Biologia de Fungos, em especial à Profª. Drª. Maria Auxiliadora, pela atenção com que sempre me tratou;

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Estudo, e ao CTPETRO, FINEP e PRONEX pelo apoio financeiro;

À Universidade Católica de Pernambuco, pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA..... 4
AGRADECIMENTOS..... 5
LISTA DE FIGURAS..... 8
RESUMO..... 10
ABSTRACT..... 11
1. INTRODUÇÃO..... 12
2. REVISÃO DA LITERATURA..... 15
2.1. O PETRÓLEO NO AMBIENTE..... 15
2.2. O GÊNERO *Cunninghamella*..... 21
2.3. ULTRAESTRUTURA..... 23
2.4. SISTEMA DE UBIQUINONAS..... 25
3. OBJETIVOS..... 30
3.1. GERAL..... 30
3.2. ESPECÍFICOS..... 30
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 31
4.1. MATERIAIS..... 31
4.1.1. MICRORGANISMO..... 31
4.1.2. MEIOS DE CULTURA..... 31
4.1.2.1. MEIO DE MANUTENÇÃO..... 31
4.1.2.2. MEIO PARA OBTENÇÃO DE ESPOROS..... 31
4.1.2.3. MEIO DE CRESCIMENTO..... 32
4.2. MÉTODOS..... 32
4.2.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS..... 32
4.2.1.1. PRÉ-INÓCULO..... 32
4.2.1.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO..... 33
4.2.1.3. TRATAMENTO COM NAFTALENO..... 33
4.2.1.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO..... 33
4.2.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS..... 34
4.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO pH..... 34
4.2.2.2. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE..... 34
4.2.2.3. EXTRAÇÃO DE UBIQUINONAS..... 35

4.2.2.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)..... 35
4.2.2.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)..... 36
4.2.3. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL..... 37
5. RESULTADOS 39
5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO..... 39
5.2. ANÁLISE DO SISTEMA DE UBIQUINONAS..... 46
5.3. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS..... 47
6. DISCUSSÃO..... 52
7. CONCLUSÕES..... 62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Geral da Ubiquinona, segundo Dr. Karl Folkers et at., 1958.....25

Figura 2. O ciclo das Quinonas.....26

Figura 3. Fluxograma de extração, isolamento, caracterização e identificação das Ubiquinonas, segundo Yamada & kondo 1973.....36

Figura 4. Perfil de Crescimento da amostra de *Cunninghamella elegans* em meio SDB sem naftaleno (controle contínuo): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28ºC, durante 120 horas.....34

Figura 5. Perfil de Crescimento da amostra de *Cunninghamella elegans* em meio SDB sem naftaleno (controle descontínuo): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28ºC, durante 120 horas.....41

Figura 6. Perfil de Crescimento da amostra de *Cunninghamella elegans* em meio SDB com naftaleno (tratada): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28ºC, durante 120 horas.....44

Figura 7. Percentual das Ubiquinonas encontradas no isolado de *Cunninghamella elegans*, cultivada em meio SDB na presença e ausência de naftaleno a 28ºC, durante 120 horas.....45

Figura 8. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB sem naftaleno (controle): Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 72 horas de cultivo 1100X. Clamidosporos (●); Hifas (★).....48

Figura 9. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB em ausência e presença de naftaleno: Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 96 horas de cultivo 900X (controle contínuo); B – 96 horas de cultivo 900X (controle descontínuo); C – 96 horas de cultivo 900X (tratado). Clamidosporos (●); Hifas (★).....50

Figura 10. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB em ausência e presença de naftaleno: Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 120 horas de cultivo 900X (controle contínuo); B – 120 horas de cultivo 900X (controle descontínuo); C – 120 horas de cultivo 900X (tratado). Clamidosporos (●); Hifas (★).....51

RESUMO

O presente trabalho, com o isolado de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), visou à avaliação do comportamento do crescimento da espécie, em presença e ausência do naftaleno, bem como a ultraestrutura e aspectos bioquímicos, através do sistema de ubiquinonas. Os resultados demonstraram a capacidade do isolado em crescer tanto em presença, como na ausência do hidrocarboneto, contudo, exibindo pequenas variações no perfil de crescimento. O estudo cromatográfico, realizado através de camada delgada e líquida de alta eficiência revelou cromatogramas com sutis diferenças no padrão de ubiquinonas. Foi observado, neste estudo, que a amostra de *C. elegans*, cultivada tanto em presença como em ausência de naftaleno, apresentou as ubiquinonas Q6 e ubiquinona Q9, como picos principais. Contudo, foi possível verificar que a amostra controle cultivada na ausência do naftaleno exibiu menor percentual da ubiquinona Q9 (98,1%) quando comparada com a amostra tratada (99,7%) em naftaleno. Com a utilização do método de rotina, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar diferenças ultraestruturais da amostra de *C. elegans*, cultivada na presença e ausência de naftaleno. Variações relacionadas aos aspectos morfológicos, à eletrondensidade das hifas, organização micelial e presença de clamidosporos foram detectadas.

Palavras Chave: *Cunninghamella elegans*, Ubiquinonas, Ultraestrutura

ABSTRACT

In the present work the isolate of *Cunninghamella elegans* (UCP 542), was studied to evaluate the growth behavior in naphthalene medium. The ultrastructure and the ubiquinone systems were also analyzed. The results demonstrated the capacity of the isolate to grow in the presence of the hydrocarbon, however, exhibiting variations in the growth profile. The naphthalene presence induced an increase in the lag phase of growth, and a reduction in the biomass yield. The chromatographic study, performed by the use of thin-layer and high-pressure liquid chromatography revealed chromatograms with differences in the ubiquinone system pattern. It was observed, in this study, that *C. elegans* presented the ubiquinones Q6 and ubiquinone Q9, as main peaks. However, it was possible to verify that control samples, cultivated in the absence of the naphthalene, exhibited smaller percentage of the ubiquinone Q9 (98,1%) when compared with the sample grown in naphthalene (99,7%). By using the routine method for scanning electron microscopy, it was possible to verify differences in the ultrastructure sample of *C. elegans.* Variations related to the morphological aspects, cell electrondensity, mycelium organization and clamidospores presence were observed.

Key Words: *Cunninghamella elegans*, Ubiquinones, Ultrastructure

1. INTRODUÇÃO

A poluição por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em ecossistemas terrestres e aquáticos tem recebido considerável atenção, devido ao fato de serem considerados compostos carcinogênicos e/ou mutagênicos, apresentando, dessa forma, efeitos tóxicos para os seres vivos, podendo ser acumulados nas cadeias tróficas. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são classificados como poluentes tóxicos prioritários pela U.S. Environmental Protection Agency. Normalmente, são encontrados no meio ambiente, devido tanto aos processos naturais quanto àqueles de natureza antropogênica (LIJINSKY et al., 1963; KEITH & TELLIARD, 1979; CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA & HEITKAMP, 1989; VALLE, 1995; ALEXANDER, 2002; PRINCE, 2002).

Nos ecossistemas, a biodegradação de derivados de petróleo, por populações naturais de microrganismos, representa um dos mecanismos primários pelos quais os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. No entanto, seu desaparecimento pode ocorrer através de uma variedade de processos abióticos, como a lixiviação e a fotodegradação. Desse modo, o grau de biodegradação e mineralização de hidrocarbonetos contaminantes, pode ser influenciado tanto por fatores físicos e químicos, quanto por fatores biológicos. Variáveis, como temperatura, pH, tipo de solo e sedimento, aeração, concentração de nutrientes, umidade, tipo e distribuição dos microrganismos, adaptação microbiana ao hidrocarboneto e a disponibilidade do composto, afetam sua degradação (CERNIGLIA & HEITKAMP, 1989; MORGAN & WATKSON, 1989;

LEAHY & COLWELL, 1990; ATLAS, 1991; VOLKERING et al., 1993; LIU et al., 1995; MENDONÇA, 2002).

Dentre os fungos, representantes do gênero *Cunninghamella* (Filo Zygomycotina / Classe Zygomycetes / Ordem Mucorales) exibem a habilidade de metabolizar compostos xenobióticos, através da excreção de hidrolases. Dessa forma, esses organismos vêm sendo estudados em função de sua potencialidade nos processos de biodegradação e biotransformação (BAIJAL & MEHROTRA, 1980; REDDY et al., 1991; FOSTER et al., 1991; POTHULURI et al., 1992; SCHWARTZ et al., 1996; ZHANG et al., 1996a; 1996b; LAMACKA & SAJBIDOR, 1998; POTHULURI et al., 1998a , 1998b).

Os hidrocarbonetos aromáticos são formados por um grande grupo de poluentes recalcitrantes, constituídos de anéis benzênicos fusionados, dispostos em vários arranjos. A literatura traz relatos sobre o potencial de espécies do gênero *Cunninghamella*, como *C. elegans*, que atuam, por exemplo, na biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), oxidando compostos, tais como antraceno, acenafteno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, fenantreno, fluoranteno e naftaleno. Esses compostos são oxidados, através de reações mediadas pela enzima citocromo P-450 monooxigenase, em um processo de monooxigenação, incorporação de um átomo de oxigênio no anel aromático (CERNIGLIA & GIBSON, 1977; 1979; CERNIGLIA, 1980; 1982; MORGAN et al., 1991).

Com a evolução das tecnologias, a microscopia eletrônica surgiu como metodologia capaz de permitir estudos mais sofisticados da estrutura celular. Através da microscopia eletrônica, tornou-se possível a análise de

proteínas/enzimas, lipídeos, fosfatos, carboidratos e ácidos nucléicos *in situ.* A partir desses estudos, informações adicionais foram geradas, as quais associadas à bioquímica, à genética e à fisiologia introduziram novas perspectivas quanto ao funcionamento da célula fúngica (HAYATT, 1989; KLOMPARENS, 1990).

Na área da Micologia, as ubiquinonas são utilizadas como marcadores bioquímicos em critérios taxonômicos e filogenéticos. A ubiquinona ou coenzima Q é uma benzoquinona lipossolúvel com uma cadeia lateral isoprenóide, contendo unidades de isopreno ligado ao carbono 6, o comprimento desta cadeia determina os diferentes tipos de ubiquinonas. Normalmente, as ubiquinonas estão associadas aos processos bioenergéticos, na transferência de elétrons da cadeia respiratória (KURAISHI et al., 1991; COLLINS, 1994).

Outrossim, é possível que a composição química do sistema de ubiquinonas esteja relacionado ao metabolismo oxidativo e fosforilativo da cadeia transportadora de elétrons e, consequentemente, ao processo de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs).

Portanto, estudos ultraestruturais e aspectos bioquímicos permitem a associação entre a morfologia, genética e biologia celular, os quais são elementos fundamentais para a elucidação de fenômenos celulares e comportamentos biológicos frente a diferentes condições ambientais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O PETRÓLEO NO 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 o ecossistema. A descoberta de que certos microrganismos que vivem em sedimentos marinhos, inclusive na areia das praias, podem degradar os componentes do petróleo, abriu a possibilidade de usar métodos biológicos para o tratamento de derrames (ROBERT, 1992; BALBA et al., 1998; TALLEY, 2002).

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 (LEAHY & COLWELL, 1990; ROBERT, 1992; BALBA et al., 1998; PRINCE 2002).

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. Todas essas atividades envolvem riscos de derrames acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados (BALBA et al., 1998; PRINCE, 2002).

Desde o primeiro grande acidente, no canal da Inglaterra, ocorreram mais de 40 grandes derramamentos marinhos de petróleo, sendo os vazamentos, durante o transporte, responsáveis por 45,5% do petróleo lançado ao mar, enquanto que os vazamentos de atividades em terra vêm em segundo lugar, representando 29% (SLOAN, 1999).

O petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e com um alto conteúdo de energia. Ele se origina do betume das rochas-mãe, que determina as diferenças na sua composição básica, ou seja, sua composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram (GESAMP, 1993).

Após a entrada no ambiente, o petróleo sofre alterações de suas características originais, devido a fatores físicos (evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, adsorção às partículas, etc) e principalmente biológicos (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 (pode afetar o ciclo de vida das espécies), condições hidrográficas e meteorológicas (pode afetar a dispersão do petróleo), clima, freqüência e duração da exposição ao petróleo e práticas utilizadas na

tentativa de duração da exposição ao petróleo e práticas utilizadas na tentativa de descontaminação (SLOAN, 1999).

O petróleo contém hidrocarbonetos, que variam de uma simples molécula, como metano, a moléculas com alto peso molecular. A maioria dessas moléculas é composta de carbono e hidrogênio, mas a maioria dos óleos contém uma pequena porcentagem de enxofre orgânico e traços de nitrogênio orgânico. Os diferentes componentes do petróleo são usualmente agrupados em frações, dependendo de suas propriedades físico-químicas. Os hidrocarbonetos componentes do petróleo podem ser divididos em quatro classes: saturados, aromáticos, asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas) (LEAHY & COLWELL, 1990).

A fração saturada compreende os n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicloalcanos (naftenos). A fração aromática, correspondente aos compostos aromáticos, é formada por um ou mais anéis benzênicos, arranjados de forma linear, angular ou em grupos. Tem sido demonstrado que os n-alcanos são mais facilmente degradáveis, seguidos por aromáticos leves, sendo que os compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como benzo(a)pireno e o criseno, contendo mais de 3 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 (LEAHY & COLWELL, 1990; SUGIURA et al., 1997).

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 aromáticos e alguns conseguem metabolizar ambos. Alcanos C_{10} a C_{26} são mais facilmente degradados. 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. Moléculas com estruturas mais complexas, contendo ramificações e anéis aromáticos, são degradadas por um número menor de microrganismos e com uma taxa de degradação menor, se comparadas com moléculas de estruturas mais simples (LEAHY & COLWELL, 1990; ATLAS & BARTHA, 1992; ATLAS, 1995).

Os efeitos tóxicos agudos do petróleo tendem a ser causados principalmente por moléculas de baixo peso molecular, que se degradam mais rapidamente. Os efeitos crônicos da poluição com o petróleo são pouco conhecidos. Contudo, supõe-se que tais efeitos se devem aos constituintes de alto peso molecular, geralmente aromáticos, que apresentam menor toxicidade, mas são recalcitrantes, causando efeitos mais duradouros. Pequenas quantidades de petróleo podem ter efeitos de longo prazo na diminuição da diversidade de espécies em um ecossistema. A diminuição da diversidade de espécies vegetais e de invertebrados marinhos em um ambiente contaminado é causada principalmente por efeitos fisiológicos, carcinogênicos e citogenéticos de longo prazo, alterando a reprodução, crescimento, respiração, movimentação e

susceptibilidade a doenças (CLARCK & FINLEY, 1982; NELSON-SMITH, 1982; STRICKLAND, 1990; HOWARTH, 1991; SUCHANEK, 1993; SPIES et al., 1996; MIDDAUGH, 2002).

A biorremediação, definida como a transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los inofensivos, pode envolver o emprego de microrganismos endógenos e/ou nativos, ou ainda pode lançar mão de microrganismos exógenos. De um modo geral, a biorremediação requer um mecanismo para estimular e manter a atividade microbiana. Normalmente, este mecanismo requer um ou mais dos seguintes componentes: um aceptor de elétrons (oxigênio, nitrato); nutrientes (nitrogênio, fósforo); e uma fonte de energia (carbono). Os principais microrganismos associados à degradação de hidrocarbonetos são as bactérias e os fungos. Os fungos filamentosos possuem algumas características que os determinam como bons degradadores. Devido ao seu crescimento micelial, os fungos ramificam-se rapidamente no substrato, degradando-o, através da excreção de enzimas extracelulares, disponibilizando, dessa forma, o acesso ao ataque bacteriano. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como por exemplo, em meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, o que favorece o seu desenvolvimento em detrimento de outros microrganismos (BOUCHEZ et al., 1996; BENNETT & FAISON, 1997).

A biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo 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. Alguns fungos podem produzir formas carcinogênicas de catecóis. Como a degradação de hidrocarbonetos para CO_2 envolve uma reação de oxidação, os organismos, em sua maioria, são aeróbios. Entretanto, parece ocorrer uma taxa lenta de degradação anaeróbia, como, como no caso do tolueno e xileno, em condições de redução de sulfato, nitrato e Fe^{+3} (LEAHY & COLWELL, 1990; ATLAS & BARTHA, 1992).

A degradação dos HAPs por fungos demonstra um importante papel em termos toxicológicos e ambientais, devido à capacidade destes em formar conjugados glicuronídeos, glicosídeos e sulfatos a partir de HAPs, essenciais no processo de detoxificação e na eliminação dos compostos aromáticos (CERNIGLIA et al., 1984).

A identificação dos mecanismos e habilidades de crescimento, bem como, o comportamento ultraestrutural e aspectos bioquímicos 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 terrestres e aquáticos têm se constituído em áreas de grande interesse (COLWELL & WALKER, 1977; ATLAS, 1981; ALEXANDER, 2002).

A confirmação do potencial de crescimento de uma espécie, com a análise das condições ambientais de cultivo pode gerar dados fisiológicos, bioquímicos e morfológicos, que implicam em uma possível otimização das condições

ambientais, que favoreçam a exploração das habilidades de um microrganismo, o que se faz altamente relevante sob o ponto de vista científico e tecnológico.

2.2. O GÊNERO *Cunninghamella*

O gênero *Cunninghamella* foi estabelecido por Matruchot, em 1903, ao descrever *C. africana*, uma espécie anteriormente descrita por Thaxter, em 1891, como *Oedocephalum echinulatum*. O gênero é caracterizado morfologicamente por apresentar micélio cenocítico ramificado, com esporângios, contendo um único esporo, sobre vesículas que podem ou não ser diferenciadas em apicais e laterais. Os esporangióforos laterais podem se dispor isoladamente ou em verticilos, e os esporângios podem ser lisos ou ornamentados com espículas. Os esporos podem ser globosos ou ovais, com paredes lisas ou ornamentadas com espinhos, geralmente unicelulares. As espécies podem formar zigosporos globosos, escuros e tuberculados que são formados entre células suspensoras, geralmente heterotálicas. Clamidosporos podem ocasionalmente ser formados. As espécies do gênero são sapróbias e encontram-se geralmente no solo e outros substratos orgânicos (DOMSCH et al., 1980; TRUFEM, 1999).

Espécies de *Cunninghamella* são muito sensíveis a pequenas variações no meio de cultura, relativas a fontes de carbono e nitrogênio, e o mesmo isolado crescido em diferentes meios pode apresentar-se com aspectos fenotípicos diferenciados. O mesmo ocorre com variações de temperatura e umidade. Esse tipo de comportamento é muito comum em fungos (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Do ponto de vista taxonômico o gênero *Cunninghamella* está essencialmente caracterizado por aspectos morfológicos e fisiológicos. Contudo, a separação das espécies, *C. elegans* e *C. bertholletiae*, por exemplo, é complexa, em função da semelhança entre estruturas reprodutivas, dificultando, conseqüentemente, a identificação. Portanto, outros parâmetros servem como subsídios à taxonomia morfofisiológica, destacando-se o estudo de marcadores bioquímicos, como auxiliares na identificação de microrganismos. Esta metodologia tem contribuído substancialmente para a resolução de vários problemas relacionados com a classificação e aspectos filogenéticos (GUSMÃO, 1990; MULLER et al., 1994; SHIOSAKI, 2001).

Entre os fungos, *C. elegans* tem sido reportada, por apresentar a habilidade de oxidar e degradar vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), tais como antraceno, acenafteno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, fenantreno, fluoranteno e naftaleno, bem como hidrocarbonetos nitratados, que são considerados agentes mutagênicos e carcinogênicos, além de possuírem efeitos tóxicos aos seres vivos e terem a capacidade de se acumular nas cadeias tróficas (POTHULURI et al., 1996).

Os fungos são organismos com extrema versatilidade de respostas relativas à adaptação em função das condições ambientais, e exibem grande potencial em inúmeros processos biotecnológicos, importância industrial, além de apresentarem importância médica. Paralelamente, por serem organismos eucarióticos, os fungos representam modelos de estudo em diferentes áreas da biologia celular, genética, fisiologia e bioquímica (CARLILE & WATKINSON, 1996; ALEXOPOULOS, 1996).

2.3. ULTRAESTRUTURA

Estruturalmente, os fungos são organismos eucarióticos e, portanto exibem, citologicamente, os caracteres desse grupo de organismos, e, de um modo geral, estão caracterizados através da microscopia óptica. A introdução da microscopia eletrônica na década de 60 para análise estrutural de fungos gerou uma nova visão sobre esse tipo celular ((HAWKER & ABBOTT, 1963; BARTINICKI-GARCIA et al., 1968; BRACKER, 1968; YOUNG,1969).

Desde o desenvolvimento da microscopia eletrônica em 1931, como método de estudo de células, uma série de metodologias, como por exemplo, a microscopia eletrônica de varredura nos anos 60, microanálise por raio X, criopreservação e técnicas imunológicas foram aperfeiçoadas. A rápida evolução do surgimento de microscópios mais modernos, como o de transmissão de alta resolução e o de varredura ambiental, permite, atualmente, inclusive, o estudo de amostras frescas e o mínimo de manipulação possível durante o processamento (KLOMPARENS, 1990; COLLINS et al., 1993).

A microscopia eletrônica tem contribuído muito na área da micologia. Os aspectos ultraestruturais são elementos fundamentais nas pesquisas e estudos sobre desenvolvimento e maturação celulares, interação célula-célula, resistência a drogas, morfogênese e caracterização de organelas. Todos esses estudos têm como objetivo final a tentativa de correlacionar ultraestrutura e atividades bioquímicas, fisiológicas e genéticas da célula fúngica (BRACKER, 1968; KLOMPARENS, 1990; MIMS, 1991).

A caracterização da ultraestrutura de fungos é fundamental para o entendimento de alguns aspectos do desenvolvimento celular, como por exemplo, germinação de esporos, interações hospedeiros-patógenos, comportamento nuclear, estudos de organelas e estudos sobre a organização celular. A avaliação ultraestrutural auxilia a taxonômia e conseqüentemente, aumenta o conhecimento sobre processos de controle de disseminação, controle de atividades economicamente importantes e patogenicidade, caracteres esses tão comuns a esse grupo de organismos (HOLLENBERG & ERICKSON, 1973; MIMS, 1991).

Com o advento da microscopia eletrônica foi possível elucidar alguns aspectos únicos da estrutura celular dos fungos, como por exemplo, a membrana citoplasmática, processos de interação fungos parasitas de plantas, identificação de elementos estruturais para estudos taxonômicos e identificação dos aspectos da estrutura fina de esporos (SAN-BLAS, 1982; TAKEO et al., 1989; KLOMPARENS, 1990; MIMS 1991; MAIA et al., 1993; SAIKAWA & KATSURASHIMA, 1993; EDELMAN & KLOPARENS, 1995a, 1995b; JONES et al., 1996; McKEOWN et al., 1996).

Técnicas microscópicas permitiram estudos sobre a estrutura fina de esporos de zigomicetos e a análise através da microscopia de varredura demonstra que esses esporos podem exibir uma superfície ornamentada, de acordo com o gênero, com estrias, apêndices e espículas (GROVE & BRACKER, 1968; VAN ETTEN et al., 1975).

A introdução de protocolos experimentais sobre aspectos ultraestruturais representa uma nova dimensão para o estudo da organização celular e

conseqüentemente, introduzirá novas perspectivas para uma avaliação mais precisa dos aspectos fisiológicos, bioquímicos e taxonômicos de fungos.

2.4. SISTEMA DE UBIQUINONAS

As quinonas são uma classe interessante e valiosa de compostos isoprenóides, devido a suas propriedades de oxidação-redução (redox), isto é, pela sua importância no sistema de transporte de elétrons, tais como a fosforilação oxidativa da cadeia respiratória e a fotossíntese. As propriedades redox das quinonas são importantes para o funcionamento das células vivas, onde os compostos chamados de ubiquinonas agem como oxidantes bioquímicos, na mediação do processo de transferência de elétrons, envolvido na produção de energia. As ubiquinonas, também chamadas de *coenzimas Q*, são componentes das células de todos os organismos, da mais simples bactéria aos seres humanos. Elas possuem este nome devido a sua ocorrência generalizada (ubíqua) na natureza (INGLEDEW & POOLE, 1984).

A Ubiquinona foi descoberta em 1957 pelo Dr. Frederick Crane e colaboradores no Enzyme Institute of the University of Wisconsin, quando foi isolada e demonstrada ser essencial nos processos bioenergéticos. Em 1958, Dr. Karl Folkers e seus colaboradores estabeleceram sua estrutura. A Ubiquinona ou coenzima Q, é uma quinona lipossolúvel, que faz parte da cadeia respiratória, possuindo uma longa cadeia isoprenóide lateral, contendo unidades de isopreno, ligada ao carbono 6 do núcleo benzoquinona. O comprimento da cadeia

hidrocarbonada determina o tipo de ubiquinona (KURAISHI et al., 1991; COLLINS, 1994) como apresentado na Figura 1.

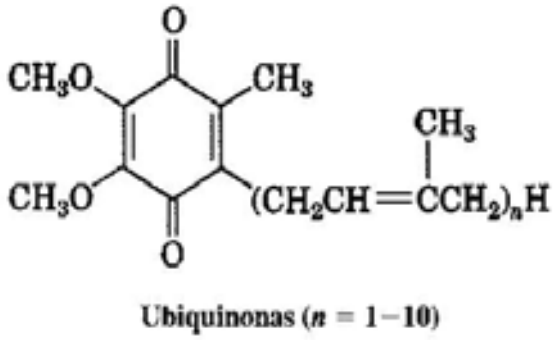

Figura 1. Estrutura da Ubiquinona Q-n, segundo o Dr. Karl Folkers et al., 1958.

As quinonas isoprenóides são formadas a partir da via metabólica shikimato, em bactérias e microrganismos eucarióticos. Em *Escherichia coli* e outras bactérias Gram-negativas a biossíntese dessa molécula origina-se a partir do composto 4-hidroxibenzoato, diretamente do corismato. Por outro lado, as leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, podem formar o 4-hidroxibenzoato a partir do chorismato ou da tirosina. Contudo, de forma análoga aos mamíferos, *S. cerevisiae* sintetiza a tirosina pela via “shikimato”. Embora as reações da via metabólica da molécula 4-hidroxibenzoato para a formação de ubiquinona seja a mesma em ambos os organismos, a ordem pela qual ocorrem são diferentes (MEGANATHAN, 2001).

A função das ubiquinonas nas mitocôndrias das células é mediar o processo de respiração, em que os elétrons são transportados do redutor biológico NADH para o oxigênio molecular. Embora o processo envolva uma série complexa de etapas, o resultado final é um ciclo em que NADH se oxida a NAD^+, O_2 se

reduz a água e energia é produzida. A ubiquinona age somente como intermediário e não se altera (COLLINS, 1994).

Além disso, a função da ubiquinona é coletar equivalentes de redução, não somente da NADH-desidrogenase mas, também, de outras desidrogenases ligadas às flavinas mitocondriais, particularmente da succinato desidrogenase e da acil-CoA desidrogenase do ciclo de oxidação dos ácidos graxos (LEHNINGER, 1988; SUZUKI et al., 1993).

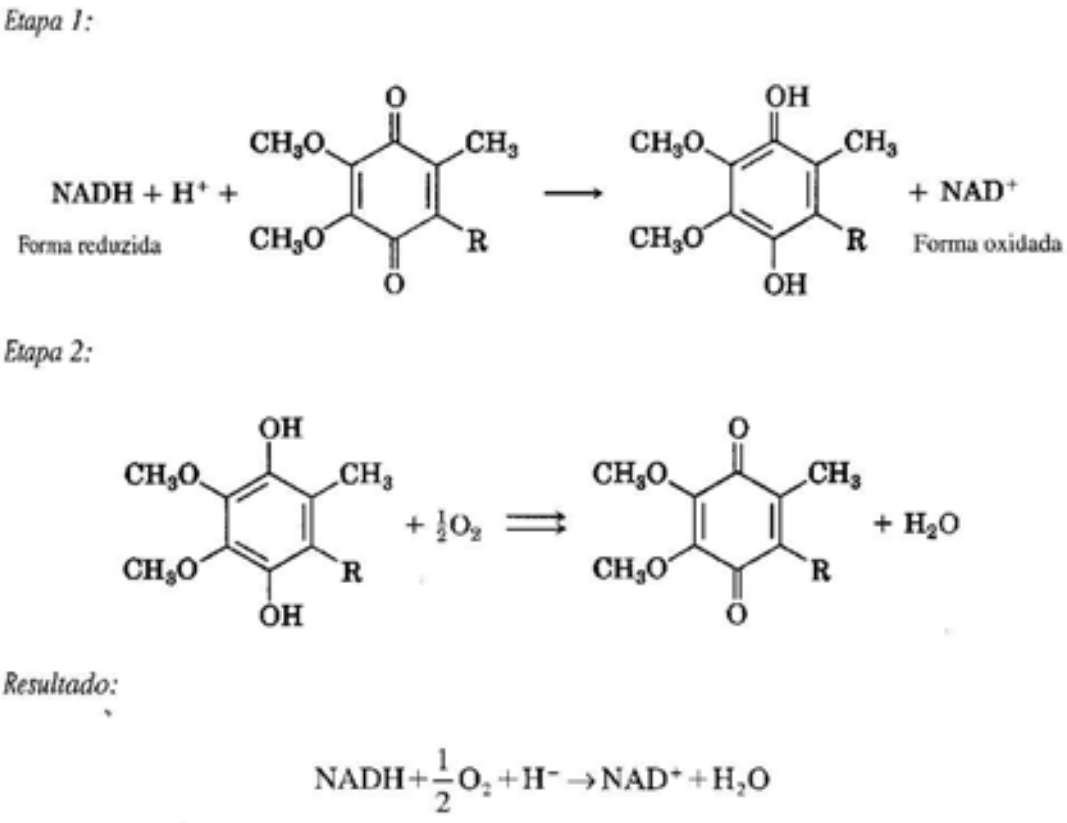

Figura 2. O ciclo das Quinonas

Assim caminha a Coenzima Q: o ciclo Q (apresentado na Figura 2).

A recepção de elétrons trazidos como QH_2 é um fenômeno de complexidade incomum. A Coenzima Q transporta elétrons aos pares, mas dentro do complexo III a condução é de um elétron por vez.

O ciclo ocorre em duas etapas:

1. QH_2 libera $2H^+$ (que são expulsos) e 1 elétron (que passa para um centro Fe-S), gerando Q^- (semiquinona). Esse elétron flui do centro Fe-S para o citocromo C_1, que o encaminha para o complexo seguinte (IV) através do citocromo C solúvel. Q^- transfere seu elétron para o citocromo b_{566} , formando Q (a qual migra para o lado da membrana mitocondrial interna voltado para a matriz). O citocromo b_{566} passa o elétron para o b_{560} que por sua vez, o devolve à coenzima Q, regenerando Q^-.

2. Nova molécula de QH_2 chega ao complexo III. Seus dois prótons são expulsos e os dois elétrons são passados um ao centro Fe-S (seguindo o fluxo da cadeia respiratória) e o outro para os citocromos b_{566} e b_{560}. A coenzima Q é liberada. O elétron que permanece no complexo III reage com a Q^- (do ciclo anterior) e $2H^+$ (da matriz), regenerando QH_2 .

O ciclo ocorre na forma de uma dismutação, em que 2 moléculas de QH_2 são transformadas em Q e QH_2 , tendo Q^- (semiquinona) como intermediária. Assim, a coenzima Q existe em três formas: QH_2 , Q e Q^- , sendo as duas

primeiras solúveis (movem-se pela membrana) e a semiquinona (Q^-) não lipossolúvel fica presa, próximo a fase aquosa da matriz.

O ciclo da coenzima Q só é possível porque Q e QH_2 difundem de um lado a outro da membrana mitocondrial interna e os dois citocromos b formam um caminho, dentro do complexo III, para os elétrons migrarem do lado externo para o lado interno da membrana mitocondrial.

O ciclo é necessário porque funciona como um transdutor que converte o fluxo de elétrons aos pares num fluxo de elétron único. No complexo III, apenas $2H^+$ são expulsos por cada par de elétrons que segue para o complexo IV. Isso é suficiente apenas para a síntese de ½ ATP (WEISS et al., 1987; CAPALDI, 1990; HOFHAUS et al., 1991).

As ubiquinonas são solúveis em solventes orgânicos. A extração com clorofórmio-metanol (2;1, v/v) produz uma mistura de material lipídico e não lipídico na qual as ubiquinonas são separadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (COLLINS, 1994).

Não foram encontradas referências sobre a utilização do sistema de ubiquinonas, relacionadas à degradabilidade de compostos derivados do petróleo por fungos.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Considerando a ausência de relatos sobre a degradabilidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) por fungos, relacionado ao sistema de ubiquinonas, bem como sobre a ultraestrutura, os estudos realizados visaram ampliar o conhecimento fisiológico, bioquímico e ultraestrutural do isolado de *Cunninghamella elegans*, cultivado em presença e ausência de naftaleno.

3.2. ESPECÍFICOS

- Estabelecer o perfil da cinética de crescimento, (pH, biomassa e consumo de glicose) do isolado de *C. elegans*, cultivado em presença e ausência de naftaleno;

- Avaliar o comportamento ultraestrutural do isolado de *C. elegans*, cultivado em presença e ausência de naftaleno, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV);

- Avaliar a composição bioquímica, sistema de ubiquinonas, do isolado de *C. elegans,* cultivado em presença e ausência de naftaleno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. MICRORGANISMOS

Foi utilizada a amostra de *C. elegans* UCP 542, obtida a partir do sedimento de mangue do Rio Formoso, município de Rio Formoso – Zona da Mata – Litoral de Pernambuco, mantido no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB – da Universidade Católica de Pernambuco.

4.1.2. MEIOS DE CULTURA

4.1.2.1. MEIO DE MANUNTENÇÃO – BDA (BATATA DEXTROSE ÁGAR)

Batata.....200g

Dextrose.....20g

Ágar.....15g

Água destilada.....1000mL

pH.....5,6

O meio foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121ºC.

4.1.2.2. MEIO PARA OBTENÇÃO DE ESPOROS – SDA (SABOURAUD DEXTROSE ÁGAR)

Glicose.....20g

Peptona.....10g

Ágar.....15g

Água destilada.....1000mL

pH.....5,6

O meio foi autoclavado durante 15 minutos à temperatura de 121ºC.

4.1.2.3. MEIO DE CRESCIMENTO – SDB (SABOURAUD DEXTROSE BROTH)

Glicose.....20g

Peptona.....10g

Água destilada.....1000mL

pH.....5,6

O meio foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121ºC.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1.1. PRÉ-INÓCULO

A amostra de *C. elegans* foi inoculada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubada à temperatura de 28ºC, como forma de manuntenção. Posteriormente, o isolado foi cultivado nas mesmas condições, durante 5 dias, em meio SDA (Sabouraud Dextrose Ágar), para obtenção de esporos. Após esse período, os esporos foram coletados, com o uso de cotonetes, previamente esterilizados e umedecidos em água destilada esterilizada, sendo determinado o número de esporos em Câmara de Neubauer.

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

4.2.1.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Alíquotas de 1 mL do pré-inóculo do isolado de *C. elegans* foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de caldo Sabouraud-Dextrose (pH 5,6), em triplicata. Os frascos foram incubados à temperatura de 28ºC sob agitação orbital de 150 Hz. Amostras coletadas nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo, foram utilizadas para a determinação da curva de crescimento, estudo ultraestrutural e bioquímico. A partir do líquido metabólico foi realizada a determinação do pH e do consumo de glicose.

4.2.1.3. TRATAMENTO COM NAFTALENO (CERNIGLIA, 1977).

Após 72h de cultivo, o micélio crescido da amostra de *C. elegans* foi coletado por filtração e transferido, assepticamente, para 50 mL de caldo Sabouraud-Dextrose, contendo naftaleno (0,5 mg/mL). Posteriormente, os frascos foram incubados à temperatura de 28ºC, durante 48h, sob agitação orbital de 150 Hz. Ao final de 48h, em presença e ausência de naftaleno, o micélio do meio de cultura foi filtrado. A massa micelial obtida foi lavada em água destilada e separada para ensaios bioquímicos e ultraestruturais.

4.2.1.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento do isolado de *C. elegans* foi construída a partir de amostras de micélio coletado, durante os intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120

horas de cultivo. A massa micelial obtida foi lavada com água destilada, por duas vezes, e submetida ao processo de liofilização até secagem completa, sendo posteriormente mantida em dessecador sob vácuo, até peso constante. A média do peso seco, em triplicata, foi utilizada para estabelecer o gráfico correspondente à curva de crescimento.

4.2.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH dos meios de cultura foi acompanhada, por potenciometria, ao longo do crescimento nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo. O valor do pH em cada ponto do intervalo foi a média de três aferições.

4.2.2.2. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático colorimétrico (Celm), que se fundamenta na oxidação enzimática da glicose pela enzima glicose-oxidase.

Após a reação, é formado um complexo cromogênico vermelho-cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose, que pode ser determinada pela leitura da absorbância à 510 nm (HENRY et al., 1974).

Amostras dos sobrenadantes de cultura coletados nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo foram utilizados para a determinação do consumo de glicose durante o crescimento.

Uma curva padrão foi elaborada, utilizando-se uma solução de glicose na faixa de 0,5 – 5,0 g/L. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, Spectronic, modelo Genesys 2.

4.2.2.3. EXTRAÇÃO DE UBIQUINONAS (YAMADA & KONDO, 1973).

Amostras de 40g de micélio, do isolado de *C. elegans,* cultivado em presença e ausência de naftaleno, foram mantidas sob refluxo à temperatura de 90°C, durante 20 minutos, em uma mistura contendo 25 mL de água destilada, 75 mL de metanol, 2,5g de pirogalol e 10g de hidróxido de sódio, para a obtenção de ubiquinonas.

A massa celular saponificada, após resfriamento com gelo, foi transferida para funil de separação de 500 mL de capacidade. As amostras foram submetidas à extração com 100 mL de n-hexano, e agitadas manualmente por 20 minutos. Após o término deste tempo, foram mantidas em repouso até separação das duas fases. A fase superior foi colocada em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, sendo, posteriormente, repetido o processo de extração por mais duas vezes. A fase hexano foi lavada três vezes com água destilada e evaporada até secura (rotaevaporador TECNAL modelo TE120), à temperatura de 40°C. Finda essa etapa, a fase hexano foi solubilizada em 2 mL de acetona, e submetida à análise através de cromatografia em camada delgada (CCD) para pré-purificação.

4.2.2.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Como suporte para a cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel G MERCK, 20x20 cm, e como sistema de solvente para separação das ubiquinonas, o benzeno.

O padrão de ubiquinona Q10 foi utilizado para identificar a região correspondente à presença da molécula.

Após a corrida cromatográfica, as amostras tratadas e controle, representadas por uma região amarela na placa, foram retiradas com auxílio de uma espátula e colocadas em Becker de 200 mL de capacidade, contendo 100 mL de acetona. Após a remoção a amostra foi submetida à agitação, em vórtex, durante 30 minutos. Ao final deste período, a amostra foi centrifugada a 3000 Hz, durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e evaporado à temperatura de 40°C.

Os extratos, contendo as ubiquinonas, foram dissolvidos em 0,5 mL de acetona, e submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificação das ubiquinonas.

4.2.2.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As ubiquinonas purificadas foram analisadas por CLAE e identificadas comparando-se o tempo de retenção das amostras, com aqueles dos padrões de ubiquinonas.

A análise foi efetuada utilizando-se uma coluna Cosmosil 5C18-P (4,6 x 250mm) e sistema de solvente metanol-isopranol (2:1, v/v), velocidade de fluxo: 1.0 mL/minuto, detector de UV: 270nm. Foram utilizados os seguintes padrões de ubiquinonas: Coenzima Q6 e Coenzima Q9 (Obtidos da Sigma Chemical Company -USA).

Um fluxograma, contendo todas as fases de isolamento, separação e identificação das ubiquinonas, utilizando-se CCD e CLAE está apresentado na Figura 3.

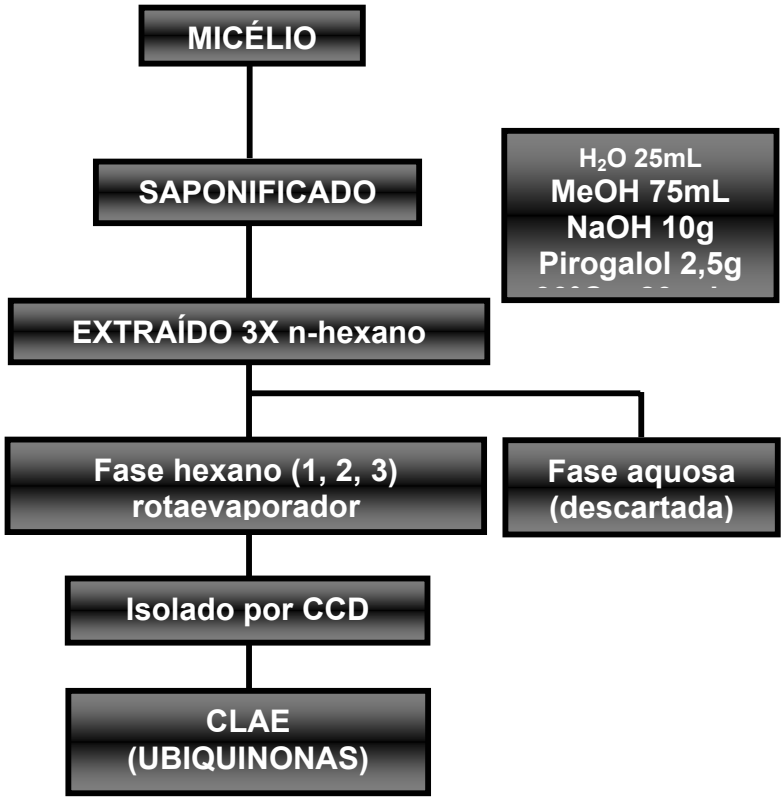

Figura 3. Fluxograma de extração, isolamento, caracterização e identificação das ubiquinonas.

4.2.3. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL (DE SOUZA, 1989)

Amostras de micélio de *C. elegans* coletadas durante os intervalos de 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de crescimento, em meio Sabouraud-Dextrose líquido, em presença e ausência de naftaleno, foram lavadas em PBS (Tampão Fosfato Salina), pH 7,2, por duas vezes, por 10 minutos. Em seguida, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Finda a etapa de fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Seguiu-se a pós-fixação, com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora à temperatura ambiente, em condições de escuridão. Em seguida as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente submetidas ao processo de desidratação.

Para a desidratação das amostras foi utilizado etanol, em proporções de 50%, 70%, 90% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico para eliminação total da fase líquida, montada em suporte de alumínio e metalizada com ouro. Assim preparadas, foram analisadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL LSM 5600.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO

O resultado obtido para o crescimento de *C. elegans*, amostra controle, cultivada na ausência de naftaleno, está apresentado na Figura 4A - B. A figura representa o crescimento do microrganismo em meio SDB, durante o intervalo de 120 horas.

A análise da Figura 4A, permite observar que a partir da inoculação dos esporos a curva de pH decresce ao longo do período de cultivo de forma contínua, até o final do período experimental, atingindo o valor de 4,1.

Ao mesmo tempo, a análise da biomassa, permite verificar que ocorre um crescimento exponencial da cultura, durante todo o período experimental. Valores de rendimentos de biomassa foram maiores para os intervalos de 96 e 120 horas, atingindo 0,24g/L e 0,44g/L, respectivamente (Figura 4B).

O consumo de glicose está apresentado na Figura 4B. Verifica-se que, durante as primeiras doze horas de cultivo, aproximadamente 90% da glicose adicionada ao meio de cultura foi utilizada para o crescimento celular.

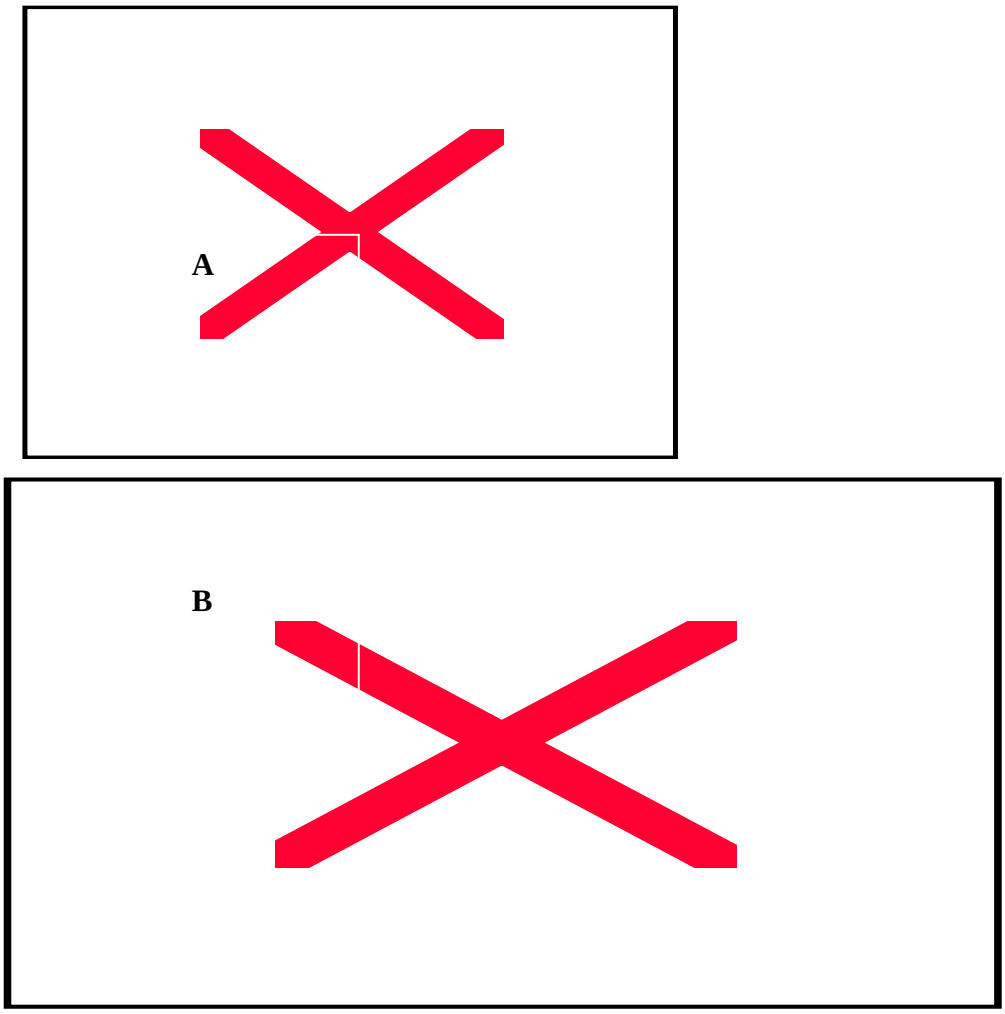

Figura 4. Perfil de Crescimento da amostra de *Cunninghamella elegans* em meio SDB sem naftaleno (controle contínuo): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28ºC, durante 120 horas.

A massa micelial da cultura, cultivada em meio SDB, com 72 horas de crescimento, foi utilizada para avaliação do crescimento de *C. elegans* na presença de naftaleno.

O crescimento foi acompanhado até 120 horas de incubação. Uma cultura não recebeu naftaleno, correspondendo ao controle experimental descontínuo.

A Figura 5 apresenta os resultados de pH, biomassa e consumo de glicose para a cultura descontínua.

Verificou-se uma queda nos valores de pH ao longo do período experimental, o qual atingiu o valor de 4.3 (Figura 5 A).

Por outro lado, verificou-se um aumento nos valores da biomassa correspondente aos intervalos de 96 e 120 horas de cultivo em relação ao controle, crescido em meio SDB de forma contínua. Valores de 0,362 g/L e 0,788 g/L foram atingidos, o que correspondeu a um aumento de 50,8% e 79%, respectivamente (Figura 5B).

O comportamento da cultura, em relação ao consumo de glicose, está apresentado na Figura 5B. Um perfil semelhante foi obtido, embora a cultura tenha recebido glicose no intervalo de 72 horas em função da inoculação em novo meio.

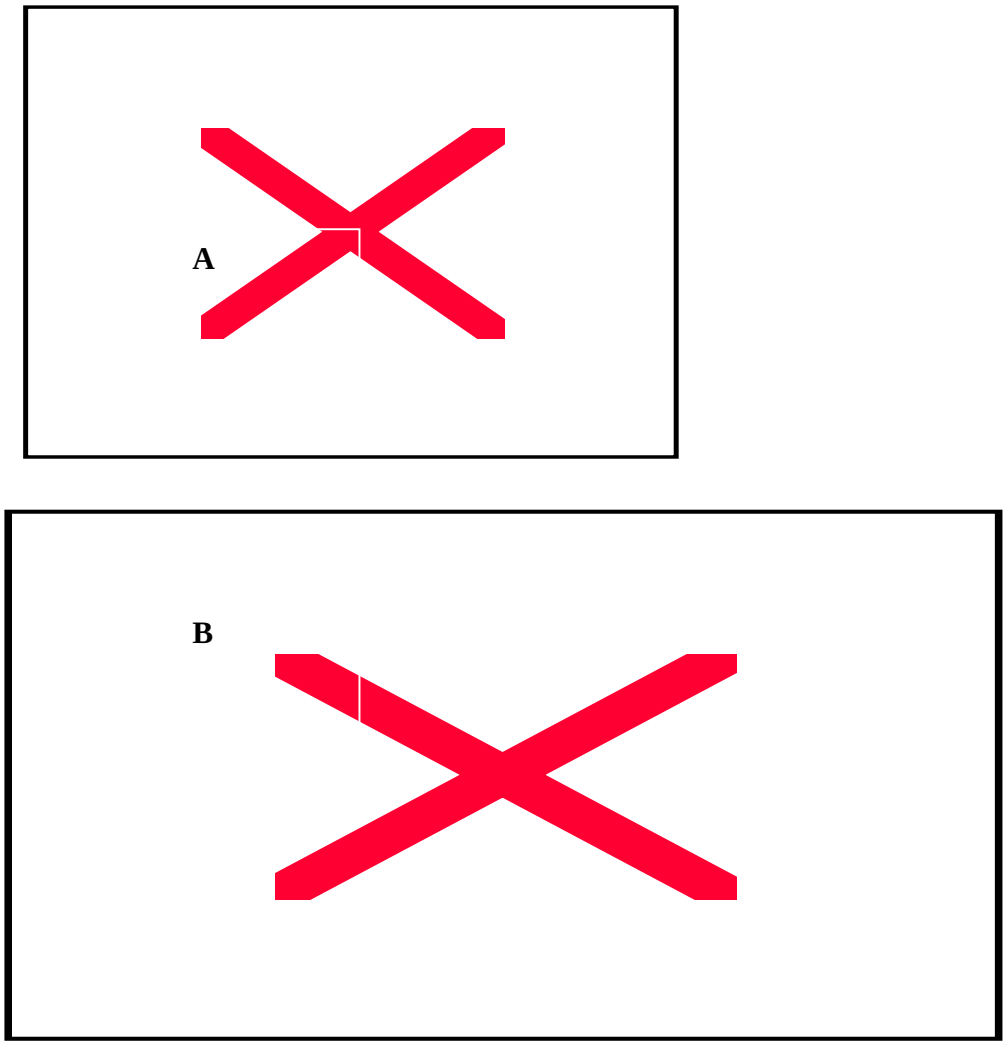

Figura 5. Perfil de Crescimento da amostra de *Cunninghamella elegans* em meio SDB sem naftaleno (controle descontínuo): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28ºC, durante 120 horas.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos para as culturas de *C. elegans*, submetidas ao tratamento com naftaleno. Após um período de 72 horas de crescimento, a massa micelial obtida, em meio SDB foi separada e inoculada em meio novo SDB, contendo 0,5 mg/mL do hidrocarboneto.

Uma análise da figura 6A permite observar que a partir da inoculação dos esporos há um decaimento da curva de pH, até o final do cultivo, atingindo o valor de 4,3.

Por outro lado, os resultados para a curva de biomassa permitem verificar valores de 0,33g/L e 0,60g/L, para as amostras correspondentes a 96 e 120 horas de incubação (Figura 6B).

As culturas submetidas ao tratamento com naftaleno, exibiram comportamento semelhante as demais em relação ao consumo de glicose (Figura 6B).

Uma análise comparativa do rendimento da biomassa permite verificar que, quando submetida ao cultivo contínuo, em meio SDB *C. elegans* exibe perfil de crescimento exponencial, durante o período experimental, não atingindo período estacionário de crescimento.

Comportamento semelhante foi observado para a cultura descontínua, contudo, a inoculação em meio novo permitiu um aumento significativo no rendimento final da biomassa, em relação à cultura tratada. Valores percentuais de 12,5% e 30%, respectivamente para os intervalos de 96 e 120 horas de cultivo.

Por outro lado, ao entrar em contato com o naftaleno, nota-se que ocorreu um aumento nos valores de rendimento da biomassa em relação à cultura mantida em meio SDB, sob regime contínuo.

Contudo, a presença do hidrocarboneto, acarretou uma diminuição do crescimento do isolado de *C. elegans*, como observado pelo rendimento da biomassa nos intervalos de 96 e 120 horas, com valores percentuais de 33% e 36,4% em relação à amostra controle descontínua.

Em relação ao consumo de glicose, uma análise comparativa permite verificar que, sob regime de cultura contínua em meio SDB, *C. elegans* consome quase que a totalidade da fonte, durante as primeiras doze horas de cultivo, correspondendo a um total de 88% da glicose adicionada ao meio, atingindo 100% da fonte no intervalo de 96 horas de incubação.

A inoculação de massa micelial de uma cultura com 72 horas de cultivo em meio SDB novo (20g/L de glicose), para o estudo do efeito do naftaleno sobre o crescimento de *C. elegans*, permitiu verificar consumo semelhante, ou seja, após 24 horas de incubação (cultura com 96 horas) nenhuma glicose foi detectada nos sobrenadantes de tais culturas.

Paralelamente, verificou-se que a adição de naftaleno, 0,5 mg/mL, no início do cultivo de *C. elegans* induziu um efeito inibidor sobre a geminação dos esporos.

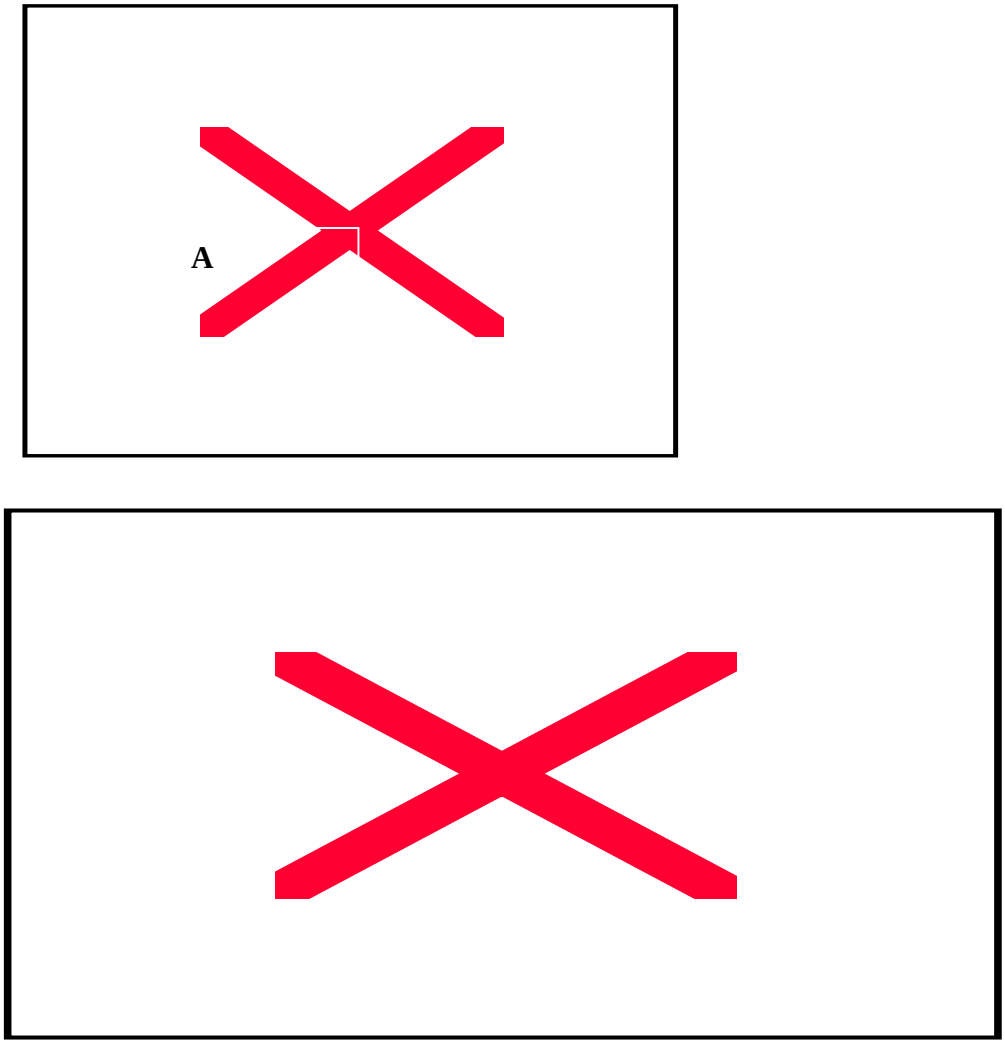

Figura 6. Perfil de Crescimento da amostra de *Cunninghamella elegans* em meio SDB com naftaleno (tratado): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28ºC, durante 120 horas.

5.2. ANÁLISE DO SISTEMA DE UBIQUINONAS

A análise cromatográfica da identificação das quinonas isoprenóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi feita por comparação dos tempos de retenção da amostra de *C. elegans*, em presença e ausência de naftaleno, com os padrões de ubiquinonas Q6 e Q9 utilizados.

Foi observado neste estudo que a amostra de *C. elegans*, cultivada tanto em presença como em ausência de naftaleno, apresentou as ubiquinonas Q6 e ubiquinona Q9, como picos principais. Contudo, foi possível verificar que a amostra controle cultivada na ausência do naftaleno exibiu menor percentual da ubiquinona Q9 (98,1%) quando comparada com a ubiquinona da amostra tratada (99,7%) como apresentada na Figura 7.

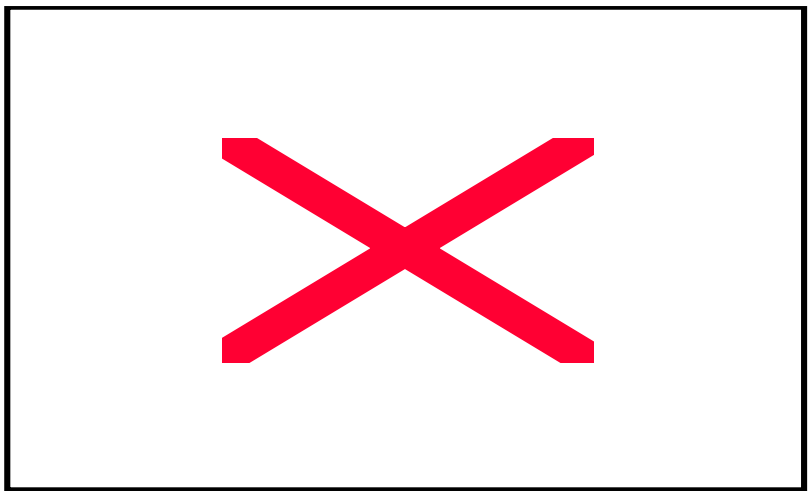

Figura 7. Percentual das Ubiquinonas encontradas no isolado de *Cunninghamella elegans*, cultivada em meio SDB, na ausência e presença de naftaleno, a 28ºC, durante 120 horas.

5.3. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS

A análise das micrografias eletrônicas, utilizando-se microscopia eletrônica de varredurra, do isolado de *Cunninghamella elegans* cultivada em presença e ausência de naftaleno estão apresentadas nas figuras 8, 9 e 10.

Na Figura 8 observa-se o micélio de *C. elegans* cultivado em ausência de naftaleno, correspondendo ao micélio da amostra com 72 horas de cultivo em meio SDB.

Nota-se que as hifas exibem textura homogênea e regular, com aspecto liso, e forma tubular. Na imagem verifica-se a presença de inúmeros clamidosporos, os quais apresentam diferentes formas, ovalados, elípticos e em forma de bastão e tamanhos diferenciados.

Adicionalmente, as hifas exibem aspecto hialino, com eletrondensidade homogênea. O micélio apresenta-se profusamente ramificado. As extremidades das ramificações exibem aspecto piriforme.

A amostra apresentada foi utilizada como inóculo padrão para os experimentos sobre o efeito do naftaleno sobre o crescimento de *C. elegans*. Outrossim, o micélio foi inoculado em meio SDB e observado durante o intervalo de 48 horas, correspondendo a cultura descontínua (sem naftaleno) e tratada.

Ressalta-se que o comportamento ultraestrutural de *C. elegans* foi observado em regimes de cultivo distintos, onde foi utilizado como padrão a amostra cultivada em meio SDB.

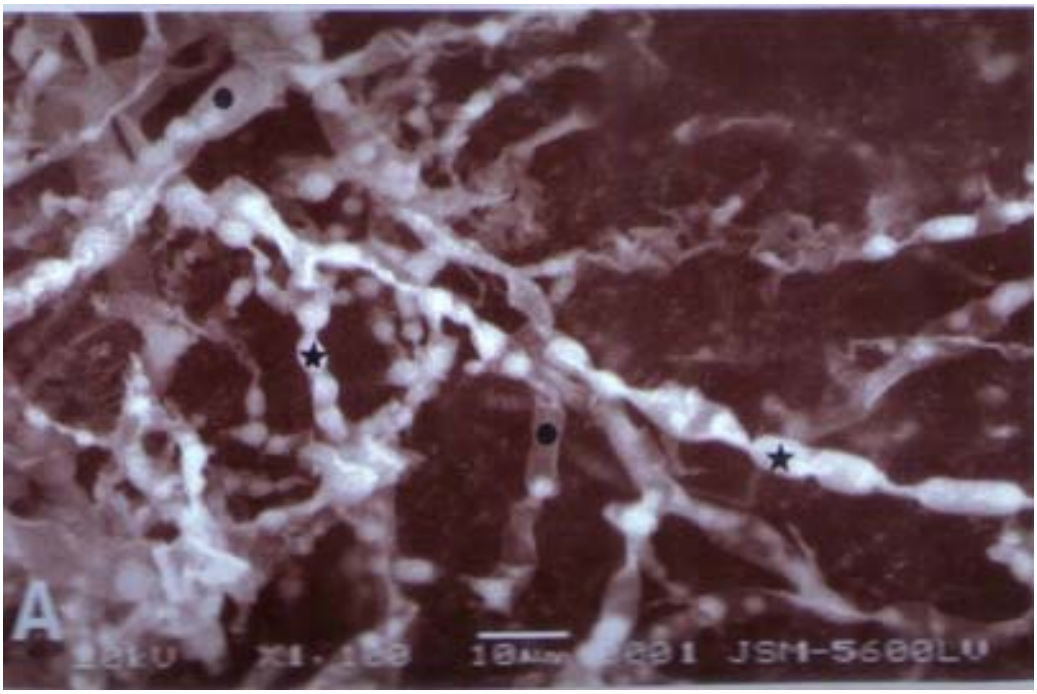

Figura 8. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB sem naftaleno (controle): Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 72 horas de cultivo 1100X. Clamidosporos (★); Hifas (●).

Eletronmicrografias das amostras de *C. elegans* com 96 horas de cultivo, contínuo, descontínuo e tratado com naftaleno a 0,5mg/mL, estão apresentadas na Figura 9 (A, B e C), respectivamente.

Uma análise comparativa da estrutura fina das amostras, permite verificar a existência de diferenças significativas relativas à eletrondensidade, número de clamidosporos e morfologia da hifa. Hifas da cultura contínua (A) exibem aspecto mais hialino e grande número de clamidosporos quando comparadas as amostras tratadas com o naftaleno.

As amostras submetidas ao regime descontínuo (inoculadas em meio SDB novo) não exibem clamidosporos, e as hifas exibem aspecto mais largo que as amostras citadas anteriormente.

A Figura 10 apresenta as hifas de *C. elegans* coletadas no intervalo de 120 horas de cultivo das culturas contínua(A), descontínua (B), e tratada com naftaleno (C). Para a cultura contínua, observa-se uma redução do número de clamidósporos e as hifas apresentam-se de forma tubular. O micélio exibe eletrondensidade homogênea (Figura 10A). Na amostra do isolado de *C. elegans*, submetida ao regime descontínuo (Figura 10B), sem naftaleno, nota-se o surgimento de clamidosporos. As hifas apresentam-se com textura homogênea, lisa e hialina. Contudo, o micélio exibe menor eletrondensidade que a amostra controle contínua (Figura 8).

A Figura 10C apresenta o micélio de *C. elegans* cultivado em presença de naftaleno com 120 horas de cultivo. Nota-se a redução do número de clamidosporos. As hifas exibem eletrondensidade homogênea e aspecto mais largo em relação às amostras das culturas controle contínua e descontínua.

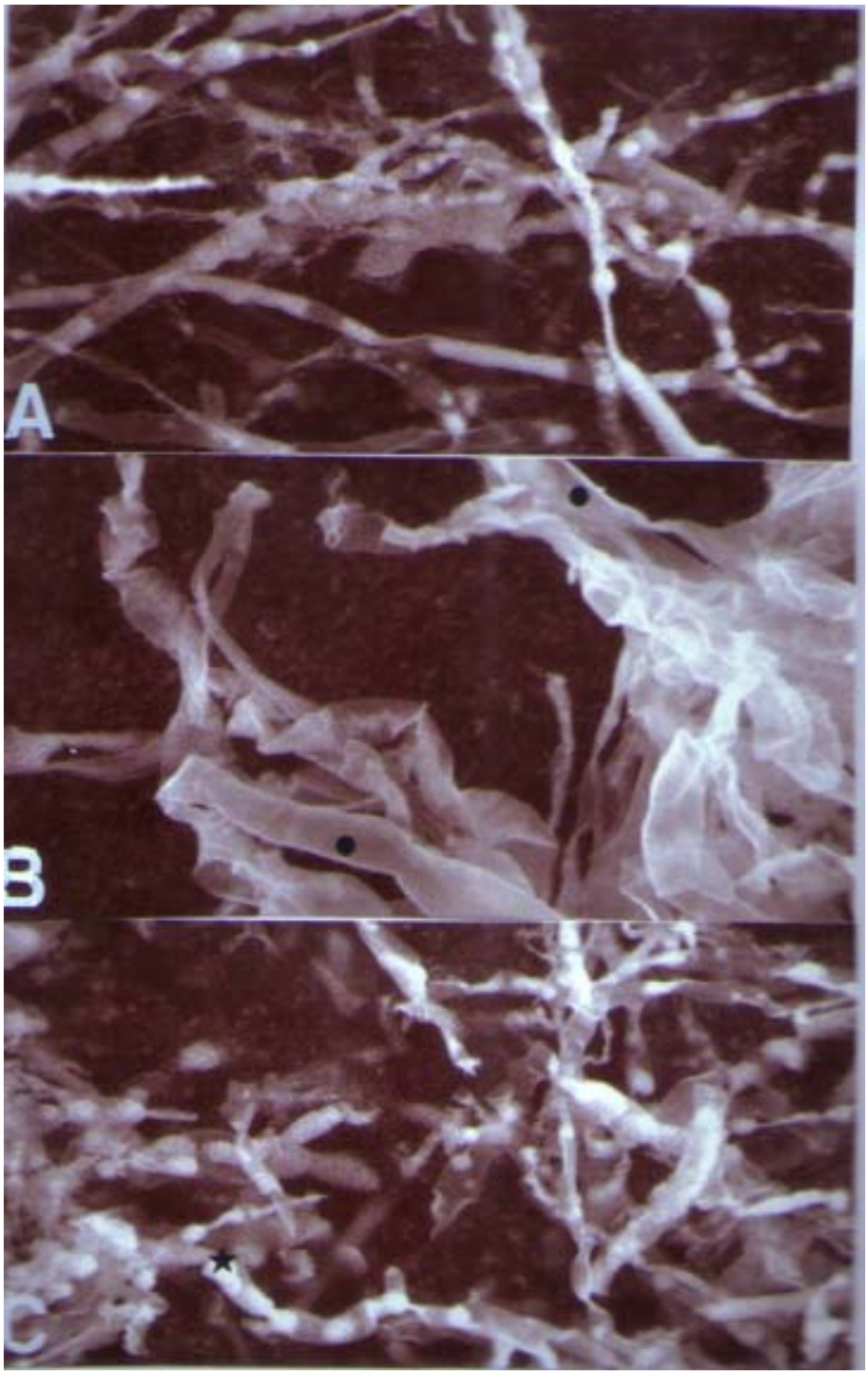

Figura 9. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB em ausência e presença de naftaleno: Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 96 horas de cultivo 900X (controle contínuo); B – 96 horas de cultivo 900X (controle descontínuo); C – 96 horas de cultivo 900X (tratado). Clamidosporos(★) ; Hifas (●).

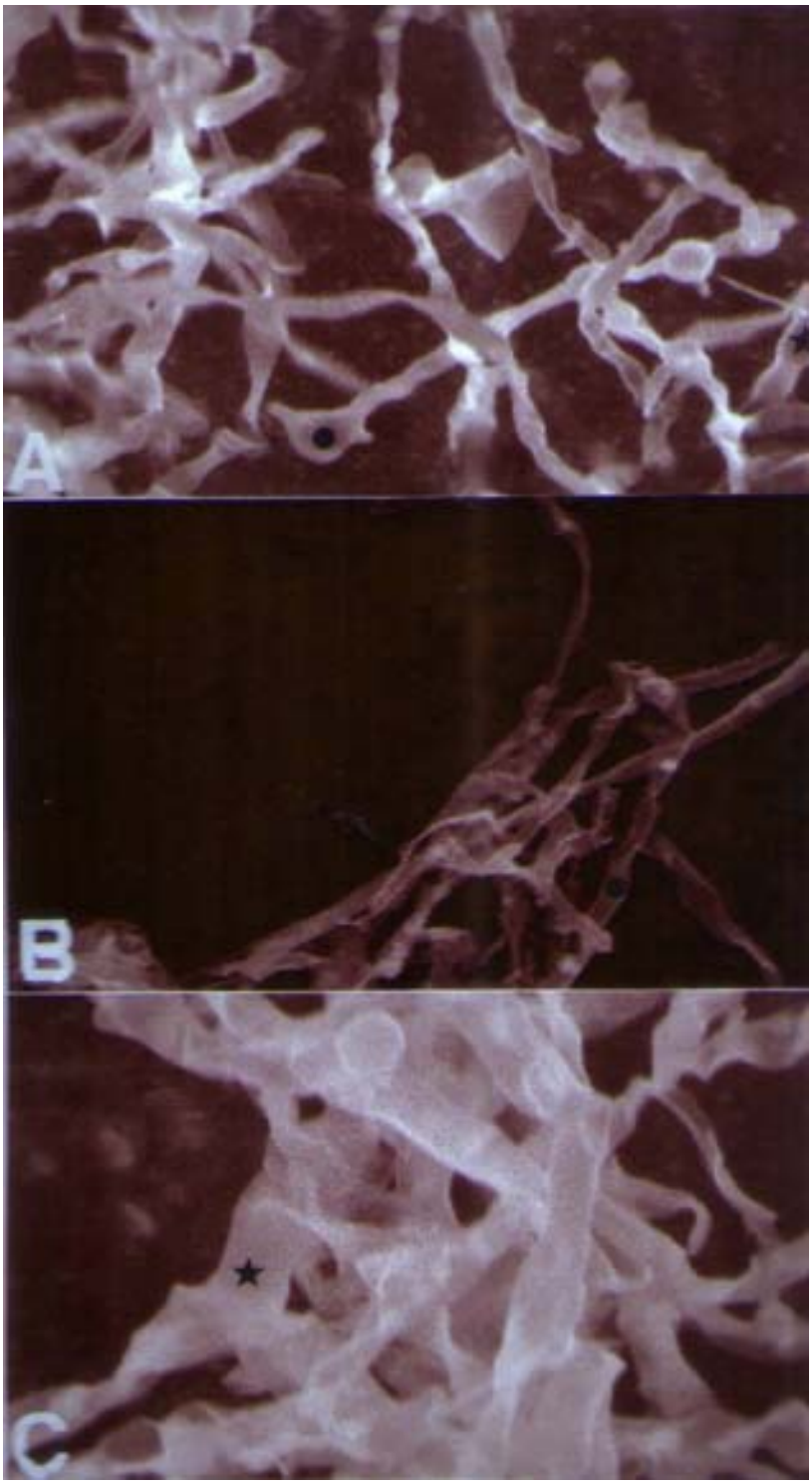

Figura 10. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB em ausência e presença de naftaleno: Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 120 horas de cultivo 900X (controle contínuo); B – 120 horas de cultivo 900X (controle descontínuo); C – 120 horas de cultivo 900X (tratado). Clamidosporos (★); Hifas (●).

6. DISCUSSÃO

A habilidade notável de sobrevivência dos fungos em diferentes nichos é conseqüência da evolução dos sistemas enzimáticos, que vêm coexistindo, durante bilhões de anos, com uma enorme variedade de substâncias naturais de diferentes origens. Esta diversidade de substratos, potenciais ao crescimento microbiano, induziu a produção de enzimas aptas a transformarem moléculas orgânicas com estruturas bastante distintas. Os "arsenais" enzimáticos têm sido, inclusive, capazes de atuar sobre substâncias químicas sintéticas, oriundas das atividades humanas. A resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas (LIU & SUFLITA, 1993; VAN DER MEER, 1994; STENBERG, 1999).

O processo de crescimento celular resulta da modificação química e estrutural na organização celular, os quais funcionam como marcadores para os diferentes estágios de desenvolvimento. Os fungos, de um modo geral, são extremamente versáteis em suas respostas em função de variações ambientais. Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação, e microelementos influenciam o metabolismo e conseqüentemente, o crescimento celular, a diferenciação, formação de estruturas reprodutivas e diferenciação sexual (ZONNEVELD, 1975; GARRAWAY & EVANS, 1984; GRIFFIN, 1994; AOKI & NIRENBERG, 1999; KANA-UCHI & KUKATSUI, 1999; KIHARA et al., 1999; KITAMOTO et al., 1999; THAM et al., 1999).

À semelhança da maioria dos fungos, as espécies de *Cunninghamella* são muito sensíveis a pequenas variações no meio de cultura e, o mesmo isolado cultivado em diferentes meios pode apresentar-se com aspectos fenotípicos diferenciados. O mesmo ocorre com variações de temperatura e umidade. Alguns trabalhos demonstraram que a presença de diferentes nutrientes, mesmo que usados, por exemplo, como fonte de carbono, induzem a ativação de sistemas enzimáticos diferenciados e, portanto, geram respostas metabólicas e fisiológicas distintas (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996).

A realização desse trabalho permitiu verificar que, a presença do naftaleno no meio de cultivo, acarreta uma diminuição do crescimento da amostra de *C. elegans* em relação à amostra controle, ou seja, a adição do naftaleno retarda, mas não impede o crescimento, quando adicionado em meio utilizando um inóculo com 72 horas de cultivo em meio SDB.

Contudo, verificou-se um efeito inibidor do naftaleno sobre a germinação de esporos quando adicionado no início do cultivo.

Diferenças no rendimento de biomassa e comportamento do pH foram observadas, contudo em relação ao estudo do efeito do naftaleno sobre o crescimento de *C. elegans*, foi possível verificar consumo de glicose semelhante, ou seja, após 24 horas de incubação (cultura com 96 horas) nenhuma glicose foi detectada nos sobrenadantes de tais culturas.

A maioria dos trabalhos não fazem menção sobre o crescimento micelial fúngico em relação a um controle, sem o hidrocarboneto aromático policíclico (HAPs).

Entre os fungos, *C. elegans* tem sido reportado por apresentar a habilidade de oxidar e degradar vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), tais como antraceno, acenafteno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, fenantreno, fluoranteno e naftaleno, bem como hidrocarbonetos nitratados, que são considerados agentes mutagênicos e carcinogênicos (GRIFFIN, 1994; POTHULURI et al., 1996; MENDONÇA, 2002).

Consideráveis esforços têm sido realizados para desenvolver uma teoria que seja capaz de explicar o consumo de substratos e a formação de biomassa por um microrganismo. De modo geral, a relação estequiométrica entre os processos catabólicos/exergônicos e os processos endergônicos que conduzem a formação de novo material (metabolismo), é representada pelo rendimento do crescimento em um dado substrato. Outrossim, trabalhos mostram que catabolismo e anabolismo são processos metabólicos interligados, e que resultam da maximização dos produtos do crescimento, os quais podem ser decisivos durante o período de depleção, reconhecido como *"starvation"* (NEIJSSEL & TEIXEIRA DE MATOS, 1994).

Alguns trabalhos revelam que metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem induzir um desequilíbrio nas reações de óxido-redução em microrganismos, comprometendo o sistema, e resultando em danos biológicos via geração de espécies reativas de oxigênio (HUANG et al., 1997; TRIPURANTHAKAM et al., 1999).

O crescente interesse pelo sistema de ubiquinonas / Coenzima Q é justificado pelo fato de que além de participar da cadeia respiratória, o sistema está envolvido nos processos de óxido-redução que ocorrem no citoplasma e sistemas

de membranas. Por outro lado, quando em sua forma reduzida, a coenzima Q apresenta característica antioxidante, protegendo eficientemente as lipoproteínas e fosfolipídios da peroxidação lipídica, e também as proteínas de membrana e o DNA dos danos induzidos pela ação de radicais livres (GENOVA et al., 1999; MIKSOVKA et al., 1999).

De forma semelhante, os mecanismos de regulação da síntese de ubiquinonas, ou seja, os níveis de ubiquinona celular, podem ser influenciados por fatores referentes a estresse oxidativo, o qual pode ser induzido como resposta a condições ambientais. Contudo, há poucos trabalhos sobre a regulação fisiológica dos níveis de ubiquinona (MEGANATHAN, 1996; GENOVA et al., 1999; MIKSOVKA et al., 1999).

Considerando que o desenvolvimento pleno de uma célula presume a associação entre a habilidade de utilização de substratos e a ativação de uma maquinaria intracelular para o surgimento de um determinado comportamento fisiológico e que a presença de um xenobiótico pode resultar na indução de respostas celulares associadas aos fenômenos de óxido-redução, o sistema de ubiquinonas de *Cunninghamella elegans* foi avaliado em presença do naftaleno.

Os resultados obtidos a partir da análise do sistema de ubiquinonas permitiram verificar que o isolado de *C. elegans*, cultivada tanto em presença como em ausência de naftaleno, apresentou as ubiquinonas Q6 e ubiquinona Q9, como picos principais, corroborando a sua presença em espécies do gênero.

Por outro lado, foi possível verificar que o isolado de *C. elegans* cultivado na ausência do naftaleno exibiu menor percentual da ubiquinona Q9 (98%) quando comparada com a ubiquinona da amostra tratada (99,7%). Podendo-se sugerir que

a presença do hidrocarboneto no meio de cultivo, influenciou de certa forma à regulação do nível de moléculas de ubiquinonas pelo microrganismo estudado.

A função da cadeia de transporte de elétrons é associar a oxidação de substratos, como carboidratos, lipídios, proteínas e hidrocarbonetos que podem ser degradados até acetil-CoA. A Ubiquinona (Coenzima Q [CoQ]) apresenta importante papel nas mitocôndrias das células eucarióticas, mediando o processo de respiração, em que os elétrons são transportados do redutor biológico, NADH, para o oxigênio molecular. Embora o processo envolva uma série complexa de etapas, o resultado final é um ciclo em que NADH se oxida a NAD^+, O_2 se reduz à água e energia (CAPALDI, 1990; CRANE, 1990; HOFHAUS et al., 1991; ELLIS, 1994; COLLINS, 1994).

Contudo, embora os complexos protéicos da cadeia respiratória NADH - Ubiquinona Redutase (Complexo I), Succinato - Ubiquinona Redutase (Complexo II), Ubiquinona - Citocromo c Redutase (Complexo III) e Citocromo c Oxidase (Complexo IV) sejam importantes para a formação de ATP, algumas vias alternativas são observadas em fungos, o que resulta, por exemplo, na resistência a inibidores respiratórios, tais como antimicina A e cianeto (VANDERLEYDEN et al., 1980; MICHEA-HAMZEHPOUR & TURIAN, 1987).

A literatura apresenta alguns estudos sobre esse tipo de via respiratória alternativa (AOD), resistente ao cianeto. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Acremonium chrysogenum*, *Pichia stipitis* e *Neurospora crassa* são alguns dos organismos estudados. Esses fungos exibem uma rota oxidase alternativa (AOD), uma oxidase terminal secundária, codificada no núcleo da célula, e regulada pelo AMP, ADP e GDP. Células que expressam

esta enzima funcionam sob condições que inibem o início da cadeia transportadora de elétrons. Por outro lado, a enzima está associada à habilidade para metabolizar o nitrato à N_2O, denitrificando-o e utilizando-o no processo de formação de ATP, como encontrado em certos fungos filamentosos, como o *Fusarium oxysporum* (KOBAYASHI et al., 1996; ANN & JAMES, 2002; ERZSÉBET et al., 2003).

Em *Escherichia coli* a concentração da ubiquinona é altamente influenciada pelo grau de disponibilidade de oxigênio. Células de *E. coli*, crescidas aerobicamente, contém significativamente mais coenzima Q8. Em leveduras sob desrepressão de glicose, o nível de ubiquinona Q6 sintetizada, aumenta (MEGANATHAN, 1996; GENOVA et al., 1999; MIKSOVKA et al., 1999).

Alguns trabalhos revelam que hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) oxidados podem afetar vários processos metabólicos em microrganismos, plantas e animais. O antraceno composto aromático com três anéis benzênicos fusionados, em sua forma oxidada, bem como suas hidroxiquinonas podem ser extremamente tóxico, agindo sobre a cadeia transportadora de elétrons na fotossíntese da *Lemma gibba* (ANKLEY et al., 1994; MACCONKEY et al., 1997; HUANG et al., 1999; TRIPURANTHAKAM et al., 1999).

A busca na literatura revela que estudos associando o comportamento das ubiquinonas frente à presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em fungos são inexistentes. Por outro lado, inúmeros estudos associando a Citocromo P450, enzima oxidativa, com a presença de hidrocarbonetos são relatados (WISLOCKI et al., 1980; COLES & KETTERER, 1990).

Os dados apresentados neste estudo constituem-se os primeiros na avaliação da relação entre sistema de ubiquinonas em *Cunninghamella elegans* em presença de naftaleno.

Dentro da Micologia as moléculas de ubiquinonas constituem uma excelente ferramenta bioquímica para delimitação de gênero em sistemática de leveduras (YAMADA et al., 1969; COLLINS et al., 1979; OYAIZU & KOGAMATA, 1981; KATAYAMA-FUJIMURA et al., 1982).

A distribuição do sistema de ubiquinonas, em espécies de fungos superiores como Ascomycotina, Basidiomycotina e Deuteromycotina, apresentam um sistema enzimático constituído pelas coenzimas Q9 e/ou coenzima Q10. Sugerindo-se que estas moléculas podem ser utilizadas na classificação dos fungos a nível genérico (KURAISHI et al., 1985).

Para os fungos Zygomycetes, SHIOSHAKI em 2001 fez uso desses marcadores bioquímicos, para determinar a composição química do sistema de ubiquinonas, em espécies do gênero *Cunninghamella*, com o intuito de verificar a possibilidade de utilização desses parâmetros como ferramenta adicional à taxonomia morfológica.

Com o advento da microscopia eletrônica foi possível elucidar alguns aspectos únicos da estrutura celular dos fungos, como por exemplo, a membrana citoplasmática, processos de interação fungos parasitas de plantas, identificação de elementos estruturais para estudos taxonômicos e identificação dos aspectos da estrutura fina de esporos (SAN-BLAS, 1982; TAKEO et al., 1989; KLOMPARENS, 1990; MIMS 1991; MAIA et al., 1993; SAIKAWA &

KATSURASHIMA, 1993; EDELMAN & KLOPARENS 1995a, 1995b; JONES et al., 1996; McKEOWN et al., 1996).

Técnicas microscópicas permitiram estudos sobre a estrutura fina de esporos de zigomicetos e a análise através da microscopia de varredura demonstra que esses esporos podem exibir uma superfície ornamentada, de acordo com o gênero, com estrias, apêndices e espículas (GROVE & BRACKER, 1968; VAN ETTEN et al., 1975).

Os estudos relacionados à estrutura fina podem ser utilizados para permitirem a elucidação do comportamento celular em diferentes condições. A microscopia eletrônica tem sido utilizada para determinação de caracteres morfológicos, bem como para a análise do comportamento molecular de diferentes espécies de organismos, o que resulta em informações que podem ser associadas a aspectos genéticos, fisiológicos e bioquímicos ampliando o conhecimento sobre o metabolismo celular (ANKLEY et al., 1994; KLOMPARENS, 1990; MIMS, 1991).

Por outro lado, os trabalhos relacionados ao estudo da ecologia microbiana mediante a utilização do microscópio eletrônico buscam, basicamente, aumentar ou consolidar conhecimentos a respeito de um processo interativo, no qual pelo menos um dos participantes é um microrganismo. Os estudos geralmente são realizados para localizar e identificar indivíduos e populações envolvidos (MARY et al., 1994; MITTAG, 1994; WARTMANN et al., 1995).

Considerando a importância dos aspectos estruturais nas respostas celulares frente a variações ambientais, uma outra abordagem utilizada neste estudo, na tentativa de avaliar o comportamento de *C. elegans* em presença de naftaleno, foi a utilização da microscopia eletrônica.

Com a utilização do método de rotina, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar diferenças ultraestruturais da amostra de *C. elegans*, cultivada na presença e ausência de naftaleno. Variações relacionadas aos aspectos morfológicos e à eletrodensidade das hifas, organização micelial e presença de clamidosporos foram detectadas.

Embora a dinâmica de qualquer processo envolva grande gama de fatores, a variação das condições físicas e 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 (FUHRMANN et al., 1993; MARY et al., 1994; MITTAG, 1994; BOLANOS et al., 1994; WARTMANN et al., 1995; SERRAJ et al., 1995; TURNAL & DEHEIMER, 1995; NICOLE et al., 1995).

Estudos associando a resposta ultraestrutural ao crescimento celular em presença de hidrocarbonetos são inexistentes. Dessa forma, os dados aqui relatados representam os primeiros sobre a estrutura fina de *C. elegans* cultivada em presença de naftaleno.

O presente trabalho aborda os aspectos do comportamento bioquímico, fisiológico e ultraestrutural de *Cunninghamella elegans* em resposta a presença de um hidrocarboneto aromático policíclico, o naftaleno. Os resultados demonstram que o composto afeta o comportamento de crescimento, e diferenças foram observadas na estrutura celular e sistema de enzimas oxidativas, o que sugere a

realização de estudos mais detalhados acerca das respostas metabólicas específicas em função do hidrocarboneto e seus intermediários.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com o estudo realizado em *Cunninghamella elegans* pode-se concluir que:

1. O isolado de *C. elegans* UCP 542 exibiu crescimento em presença do naftaleno;

2. A presença do naftaleno no meio de cultivo, acarreta uma diminuição do crescimento da amostra de *C. elegans* em relação à amostra controle descontínua, porém não inibe seu crescimento;

3. A presença do hidrocarboneto no meio de cultivo influencia a expressão de ubiquinonas pelo microrganismo estudado, verificando-se que o isolado de *C. elegans*, cultivado em presença do naftaleno, apresenta maior percentual da ubiquinona Q9 quando comparada com a amostra controle;

4. A análise ultraestrutural pelo método de rotina, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, permite verificar diferenças na estrutura fina da amostra de *C. elegans*, em relação aos aspectos morfológicos, presença de clamidosporos, organização micelial e eletrodensidade das hifas, em presença e ausência do hidrocarboneto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, R. R., Tang, J. X. and Alexander, M. Genotoxity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, 150-154, 2002.

Atlas, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v.45, p.180-209. 1981.

Atlas, R.M. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Oil Spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.52, p.149-156, 1991.

Atlas, R.M.: Bartha, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 12, p.287-338, 1992.

Atlas, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Pollution Bulletim**, v. 31, p.178-182, 1995.

Baijal, U.; Mehrotra, B.S. The genus *Cunninghamella* – A Reassessment. **Sydowia**, v.33, 1-13. 1980.

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.

Bartnicki-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 22, p. 87 – 108, 1968.

Bennett, J.W.; Faison, B.D. Use of fungi in Biodegradation. In: **Manual of Environmental Microbiology**, Ed. Chridton J. Hurst, J. ASM Press, Washington D. C., USA, p.758-765, 1997.

Bolanos, L; Esteban, E; Lorenzo, C; Fernandez Pascual, M; Felipe, M.R; Garate, A; Bonilla, I. essentially of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (Pisum sativum) rhizobium nodules. **Plant Physiology**. Rockville, v.104. n1, p.85-90, 1994.

Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F., Vandecasteele, J. P. "Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environment", **Revue de l'Institut français du pétrole**, vol.51, nº6, p.794-828, 1996.

Bracker, C. E. - The Ultrastructure and Development of Sporangia in *Gilberteria persicaria*. **Mycology**, v. 60, p. 1016-1067,1968.

Capaldi, R. A. Structure and function of cytochrome c oxidase. **Annual Reviews of Biochemistry**, 59:569-596, 1990.

Cerniglia, C. E.; Gibson, D. T. Metabolism of Naphtalene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.363-370, 1977.

Cerniglia, C. E.; Gibson, D. T. Algal oxidation of aromatic hidrocarbons: formation of 1-naftol from naphtalene by *Agmenellum quadruplication* strain PR-6. **Biochemical & Biophysical Research Communication**, v.88, p. 50-58, 1979.

Cerniglia, C. E. Initial reactions in the oxidation of anthracene by *Cunninghamella elegans*. **Journal of General Microbiology**, v.128, p.2055-2061, 1982.

Cerniglia, C.E. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v.30, p. 31-69, 1984.

Cerniglia, C. E.; Heitkamp, M.A. Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hidrocarbons (PHA) in the Aquatic Environment. In: VARANASI, U., ed. **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 41-68.

Clark, R. C.; Finley, J.S. Occurence and impact of petroleum on Arctic environments. In: REY, L. (Ed.). **The arctic ocean – the hydrogaphic environment and the fate of pollutants**. New York: Jonh Wiley, p.295-314. 1982.

Coles, B., and Ketterer, B. **Critical Review Biochemical Mololecular Biological**. 25, 47-70, 1990.

Collins, M. D. Isoprenoid quinones. **In Chemical methods in prokaryotic systematics**, pp. 265-309. Edited by Goodfellow, M. & O'Donnell, A. G. John Wiley & Sons, Chichester, 1994.

Collins, S.; Pope, R. K.: Scheetz, R. W.; Ray, R. I.; Wagner, P. A. & Little, B. J. Advantages of environmetal scanning electron microscopy in studie of microorganisms. **Microscopy Research Technology**, v. 25, p. 398-408,1993.

Colwell, R. R.; Walker, J. D. Ecological Aspects of Microbial Degradation of Petroleum in the Marine Environmental. **Critical Reviews in Microbiology**, v.5, p.423-445, 1977.

Crane, F. L. **Development of concepts for the role ubiquinones in biological membranes**, p. 3-17. In: G. Lenaz, G. Barnabei, A. Rabbi, and M. Battino (ed.). Highlights in ubiquinone research, Taylor & Francis, London, United Kingdom. 1990.

De Souza, W. – Citoquímica. In: De Souza, W. **Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica**. Volume II. Citoquímica Ultraestrutural. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 1989.

Edelmann, R. E. & Klomparens, K. L. Zygosporogenesis in *Zygorhynchus heterogamus*, with a proposal for standardization of structural nomenclature. **Mycology**, v. 87, p. 304 – 318, 1995a.

Edelmann, R. E. & Klomparens, K. L. Low temperature scanning electron microscopy of the ultrastructual development of zygospores and sporangiospores in *Mycothipha africana*, and the effects of cultural conditions on sexual versus asexual reprodution. **Mycology**, v. 90, p. 212-218, 1995b.

Ellis, J. E. Coenzyme Q homologs in parasitic protozoa as targets for chemotherapeutic attack. Parasitol. Today 10:296-301, 1994.

Foster, B. C.; Lister, D. L.; Zamecnik, J.; Coutts, R. T. The biotransformation of Tranylcypromine by *Cunninghamella equinulata*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.791-795. 1991.

Fuhrmann, S; Overmann, J; Pfennig, N; Fischer, U. Influence of vitamin B_{12} and light on the formation of chlorosomes in green and brown colored *Cholorobium species*. **Archives of Microbiology**, Berlim, v.160. p.193-198, 1993.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UNEP) Joint group of experts on the scientific aspects of marine pollutin). Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. **GESAMP**, v.50, 180p. 1993.

Hayatt, M. A. – **Principles and Techniques of Eletron Microscopy. Biological Application**. 3rd Edition. Macmillan Press Scientific & Medical Ltd. 469p, 1989.

Hawker, L. E. & Abbott, P. McV. An electron microscopy study of maturation and germination of sporangiospores of two species of *Rhizopus*. **Journal of General Microbiology**, v. 32, p. 295 – 298, 1963.

Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Winkelman, J. W. **Clinical chemistry, principles and technics**. 2nd . Ed. New York, Haper & Row, 1974.

Hofhaus, G.; Weiss, H.; Leonard, K. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). **Journal Molecular Biological**. 221:1027-1043, 1991.

Hollenberg, M. J. Erickson, A. M. The scanning electron microscopy: potencial usefulness to biologists. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, p. 109-130, 1973.

Howarth, R. W. Assessing the ecological effects of oil pollution from outer continental shelf oil development. **Transactions of American Fisheries Society**. v.11, p.1-8, 1991.

Huang X-D, McConkey BJ, Babu TS, Greenberg BM. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: Inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemma gibba*. **Environmental Toxicology Chemical** 16:1707-1715, 1997.

Ingledew, W. J. & Poole, R. K. The respiratory chains of *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews** 48: 222-271, 1984.

Jones, D.; Vaughan, D. & McHardy, W. J. A critical examination of SEM ultrastructural features in two *Penicillium thomii* isolates from soil. **Mycological Research**, v. 100, p. 223-228, 1996.

Keith, L. H.; Telliard, W. A. Priority Pollutants I: A Perspective View. **Environment Scienc and Tecnology**, v.13, p.416-423, 1979.

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

Kuraishi, H.; Aoki, M.; Itoh, M. and Katayama, Y. Distribuition of Ubiquinones in *Penicillium* and related genera. **Mycological Research**, v.95, n.6, p.705-711, 1991.

Lacerda, L. D. Manguezais: Floresta de beira-mar. **Ciência Hoje**. São Paulo, 3(13): p.626-670, 1984.

Lamaka, M. & Sajibdor, J. The content of prostaglandins and their precursors in *Mortierella* and *Cunninghamella* species. **Letters Applied Microbiology**, V.26, p.224-226. 1998.

Leahy, J. G.; Colwell, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, v.54, p.305-315, 1990.

Lijinsk, W.; Domsky, I.; Mason, G.; Ramahi, H. Y.; Safavi, T. The Chromatografic determination of Trace Amounts of Polynuclear Hydrocarbons in Petrolatum, Mineral Oil, and Coal Tar. **Analytical Chemistry**, v. 35, p. 952-956, 1963.

Lehninger, A. L. **Princípios de Bioquímica**. Savier – São Paulo. 4 ed. 725p, 1988.

Liu, S.; Suflita, J. M. Ecology and Evolution of Microbial Populations for Bioremediation. **TIBTECH**, v.31, p.344-352, 1993.

Liu, Z.; Jacobson, A. M.; Luthy, R.G. Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.145-151, 1995.

Maia, L. C.; Kimbrough, J. W. & Bennyg. Ultrastructural studies of the spore wall of *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycology**, v. 85, p. 883-889, 1993.

Mary, P; Dupuy, N; Biremon, C. D.; Devifes, C. Tailliez, R. Differences among *Rizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to desiccation and storage at different relative humidities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26. n.9.p.1125-1132, 1994.

Mckeown, T. A., Moss, S. T., Jones, B. G. - Ultrastructure of Ascospores of *Tunicaspora australiensis.* **Mycological Research**, v. 100**,** p. 1247-1255, 1996.

Mendonça, E. and Picado, A. Ecotoxicological monotoring of remediation in a coke oven soil. **Environmental Toxicological**. 17, 74-79, 2002.

Middaugh, D. P., Chapman, P. J., Shelton, M. E., McKenney, C. L. Jr., and Courtney, L. A. Effects of fractions from biodegraded Alaska North Slope crude oil on embryonic inland silversides, *Menidia beryllina*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. 42, 236-243, 2002.

Mims, C. W. - Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycology**, v. 83, p. 1-19. 1991.

Mittag, H. Structural alterations in *Candida albicans* by caffeine salts. **Mycoses**, Berlim. V.37, n.9-10, p.337-341, 1994.

Morgan, P.; Watkinson, R. J. Hydrocarbon Degradation in Soils and Methods for Soil Biotreatment. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.8, p.305-333, 1989.

Morgan, P.; Lewis, S. T.; Watkinson, R. J. Comparasion of Abilities of White-Rot Fungi to Mineralize Selected Xenobiotic Compounds. **Applied Microbiological Technology**, v.34, p.693-696, 1991.

Neijssel, O. M. & Teixeira de Matos, M. J. The energetics of bacterial growth: a reassessment. **Mol Microbiol** 13, 179-182, 1994.

Nelson-Smith, A. Biological consequences of oil-spills in Arctic waters. In: REY L. (Ed.). **The arctic ocean**: the hydrographic environment and the fate of pollutants. New York: John Wiley, p.275-293, 1982.

Pothuluri, J. V.; Freeman, J. P.; Evans, F. E.; Cerniglia, C. E. Metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p.3654-3659. 1992.

Pothuluri, J. V.; Doergge, D. R.; Churchwell, M. I.; Fu, P. P.; Cerniglia, C. E. Fungal Metabolism of Nitrofluoranthenes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.53, p.153-174. 1998.

Pothuluri, J. V.; Sutherland, J. B.; Freeman, J. P.; Cerniglia, C. E. Fungal Biotransformation of 6-nitrochrysene. **Applied Environmental Microbioloigy**, v.64, p. 3106-3109. 1998.

Prince, R. C. Petroleum and other hydrocarbons, biodegradation of. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology** (G. Bitton, G., ed.) John Wiley, New York, pp. 2402-2416, 2002.

Robert, E. R. Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites. CK Smoley Publishers, New York. 1992.

Reddy, C. S.; Acosta, D.; Davis, P. J. Microbial Models of Mammalian metabolism: biotransformations of Phenacetin and its O-alkyl Homologues with *Cunninghamella* species. **Xenobiotica**, v.20, p.1281-1297. 1990.

Saikawa, M. & Katsurashima, E. Light and electron microscopy of a new species of *Euryancale* producing phallus-shaped conidia. **Mycology**, v. 85, p. 24-29,1993.

San-Blas, G. The cell wall of fungal human pathogens; it's possible role in host relationships. **Mycopathologia**, v. 79, p. 159-184, 1982.

Schwartz, H.; Liebig Weber, A; Hochstatter, H.; Bottcher, H. Microbial oxidation of ebastine. **Applied Environmental Microbiology**, v.44, p.731-735. 1996.

Sloan, N. A. **Oil Impacts on cold-water marine resources**: A review relevant to parks Canada's evolving marine mandate. http:/parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasional_paper11_e. PDF(04 jan. 2004).

Spies, R. B.; Rice, S. D.; Wolfe, D. A.; Wright, B. A. The effects of the Exxon Valdez oil spill on the Alaskan coastal environment. In: EXXO VALDEZ Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium. Bethesda: **American Fisheries Society Symposium**, v.18, p.1-16. 1996.

Strickland, R. M. The Pacific northwest coast: fossil fuel frontier. **Environment Journal**, v.6, p.25-77, 1990.

Suchanek, T. H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. **American Zoologist**, v.33, p. 510-523, 1993.

Sugiura, K., M. Ishihara, T. Shimauchi y S. Harayama. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. **Environmental Science Technology**. 31: 45-51, 1997.

Suzuki, k.; Goodfellow, M. & O'Donnell, A. G. **Cell envelopes and classification**. In Handbook of new bacterial systematics, pp. 195-250. Edited by Goodfellow, M. & O'Donnell, A. G. Academic Press, Lodon, 1993.

Talley, J. W., Ghosh, U., Tucker, S. G., Furey, J. S. and Luthy, R. G. Particule-scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment. **Environmental Science Technology**. 36, 477-483, 2002.

Takeo, K.; Mine, H.; Sano, A. ; Nishimura, K.; Miyaji, M. - Comparision of Yeast Plasma Membrana Ultrastucture of Various Fungal Taxa. **Proceedings of the Fourth International Symposium of the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses**, Chiba University. p. 81-84, 1989.

Tripuranthakam S, Duxbury CL, Babu TS, Greenberg BM. Development of a mitochondrial respiratory electron transport bioindicator for assessment of hydrocarbon toxicity. In: Henshel D, Black MC, Harris MC, eds, **Environmental Toxicology and Risk Assessment**, Vol 8. STP 1364. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp350-361.

Van der Meer, J. R. Potential and Limitation to use Microbiological Methods for the Treatment of Environmental Pollution. **EAWAG**, v.36, p.20-23, 1994.

Valle, C. E. Qualidade Ambiental: como ser competitivo protegendo o meio ambiente (como se preparar para as normas ISO 14000). Pioneira, São Paulo, 137p, 1995.

Van der Meer, J. R. Genetic Adaptation of Microorganisms to Environmental Pollutants. **EWAEG**, v.36, p.20-23, 1994.

Volkering, F.; Breure, A.M.; van Andel, J. G. Effect of Microorganims on the Bioavailability and Biodegradation of Crystaline Naphtalene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.535-540, 1993.

Yamada, and Kondo, K. Coenzyme Q System in the classification of the yeast like genera *Sporobolomyces* and *Rhodosporidinne*. **Journal General Applied Microbiology** 19: 59-77, 1973.

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

Zhang, D.; Hansen, E. B. Jr.; Deck, J.; Heinze, T. M.; Sutherland, J. B.; Cerniglia, C. E. Fungal Biotransformation of the antihistamine azatadine by *Cunninghamella elegans.* **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p.3477-3479. 1996.

Zhang, D.; Freeman, J. P.; Sutherland, J. B.; Walker, A. E.; Yang, Y.; Cerniglia, C.E. Biotransformation of chlopromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.798-803. 1996.

Wartmann, T.; Kruger, A; Adler, K.; Duc, B. M; Kunze. Temperature dependent dimorphism of the yeast *Arxula adeninivorans* Ls3. **Antonie van Leevwenhoek**. V.68. n.3, p. 215-223, 1995.

Weiss, H.; Linke, P.; Haiker, H.; Leonard, K. Structure and function of the mitochondrial ubiquinol: Cytochrome c reductase and NADH: Ubiquinone reductase. **Biochemical Society** . 15:100-102, 1987.

Wislocki, P. G., Miwa, G. T., and Lu, A. Y. H. In: **Enzimatic Basis of Detoxification** (Jakoby, W. B., ed) Vol.1, pp. 135-182, Academic Press, New York, 1980.