

MARCOS ANTONIO BARBOSA DE LIMA

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E CITOQUÍMICOS DO
POLIFOSFATO EM *Cunninghamella elegans*.

Recife-PE
2003

MARCOS ANTONIO BARBOSA DE LIMA

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E CITOQUÍMICOS DO
POLIFOSFATO EM *Cunninghamella elegans*.

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: Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Aline Elesbão do Nascimento

**Recife-PE
2003**

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki pela orientação, compreensão e incentivo no decorrer de todos esses anos de trabalho;

À Prof^ª. Dr^ª. Aline Elesbão do Nascimento pela atenção, amizade e ensinamentos durante todos esses anos de convívio e trabalho;

À Prof^ª. Dr^ª. Allana Elesbão do Nascimento Shari'a pela paciência com que me transmitiu as bases do estudo ultraestrutural;

À Prof^ª. Dr^ª. Kaoru Okada pelas informações fornecidas para a realização de alguns experimentos;

Aos companheiros Patrícia Mendes e Petrusk Homero pela constante ajuda, não apenas, no transcorrer desse trabalho, mas desde os tempos de iniciação científica;

À Humberto, técnico do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais-NPCIAMB, pela solicitude e presteza dos seus serviços;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica e mestrado, e ao FINEPE e PRONEX pelo apoio financeiro;

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

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Prof^ª. Dr^ª. Neiva Tinti, pela presteza dos trabalhos realizados;

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos pela atenção e conhecimentos transmitidos.

DEDICO

Aos meus pais, João Barbosa da Cruz e Sueli Barbosa de Lima, pelo apoio, incentivo e educação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
DEDICATÓRIA	4
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Polifosfato.....	13
2.2. Fungos: Classe Zygomycetes.....	16
2.3. Gênero: <i>Cunninghamella</i>	18
2.4. Ultraestrutura	19
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Materiais	23
4.1.1. Microorganismo	23
4.1.2. Meios de cultura	23
4.1.2.1. Meio de manutenção e esporulação.....	23
4.1.2.2. Meio de crescimento.....	24
4.2. Métodos	25
4.2.1. Métodos microbiológicos	25
4.2.1.1. Pré-Inóculo	25
4.2.1.2. Condições de cultivo	25
4.2.1.3. Determinação da curva de crescimento	26
4.2.2. Ensaio bioquímico	26
4.2.2.1. Determinação do pH.....	26

4.2.2.2. Determinação de fosfato	26
4.2.2.3. Determinação de glicose.....	27
4.2.2.4. Extração do polifosfato total.....	27
4.2.2.5. Extração sequencial do polifosfato.....	28
4.2.3. Estudo ultraestrutural.....	30
4.2.3.1. Técnica de rotina	30
4.2.3.2. Citoquímica para polifosfato	31
5. RESULTADOS	32
5.1. O efeito da concentração de ortofosfato sobre o crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i>	32
5.2. Acumulação de fosfato por <i>Cunninghamella elegans</i>	38
5.3. Caracterização das frações do polifosfato	41
5.4. Aspectos ultraestruturais do polifosfato	44
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES.....	59
8. BIBLIOGRAFIA	60
9. ADENDO	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos propostos para a regulação do metabolismo do polifosfato (Johnston e Carlson, 1992; Oshima 1997).....	15
Figura 2. Esquema da extração sequencial do polifosfato.....	29
Figura 3. Perfil de crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada no meio SMM1: pH (A); crescimento e consumo de fosfato (B); consumo de glicose (C).....	33
Figura 4. Perfil de crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada no meio SMM2: pH (A); crescimento e consumo de fosfato (B); consumo de glicose (C).....	35
Figura 5. Perfil de crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada no meio SMM3: pH (A), crescimento e consumo de glicose (B)	37
Figura 6. Curva de acumulação de polifosfato (A) relacionada ao consumo de fosfato e glicose (B) por <i>Cunninghamella elegans</i> no meio SMM1	39
Figura 7. Curva de acumulação de polifosfato (A) relacionada ao consumo de fosfato e glicose (B) por <i>Cunninghamella elegans</i> no meio SMM2	40
Figura 8. Perfil das frações de polifosfato obtidas através de extração sequencial da biomassa de <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada nos meios SMM1 (A) e SMM2 (B).....	42
Figura 9. <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada em meio SMM1: Eletronmicrografia de Transmissão- Método de rotina. A- 3 dias de cultivo 14000X; B- 6 dias de cultivo 8000X; C- 9 dias de cultivo 14000X; D-12 dias de cultivo 14000X. Parede celular (→), Corpos eletrondensos (*).....	45

- Figura 10. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM2: Eletronmicrografia de Transmissão- Método de rotina. A- 3 dias de cultivo 20000X; B- 6 dias de cultivo 20000X; C- 9 dias de cultivo 20000X; D-12 dias de cultivo 8000X. Parede celular (→), Corpos eletrondensos (✱)..... 46
- Figura 11. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM3: Eletronmicrografia de Transmissão- Método de rotina. A- 3 dias de cultivo 14000X; B- 6 dias de cultivo 14000X; C- 9 dias de cultivo 14000X; D-12 dias de cultivo 10000X. Parede celular (→), Corpos eletrondensos (✱)..... 48
- Figura 12. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM1: Eletronmicrografia de Transmissão- Citoquímica para polifosfato. A- 3 dias de cultivo 20000X; B- 6 dias de cultivo 27000X; C- 9 dias de cultivo 20000X; D-12 dias de cultivo 14000X Produtos de marcação citoquímica (▶) 51
- Figura 13. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM2: Eletronmicrografia de Transmissão- Citoquímica para Polifosfato. A- 3 dias de cultivo 27000X; B- 6 dias de cultivo 20000X; C- 9 dias de cultivo 50.000X; D-12 dias de cultivo 20000X. Produtos de marcação citoquímica (▶) 52
- Figura 14. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM3: Eletronmicrografia de Transmissão- Citoquímica para polifosfato. A- 3 dias de cultivo 20000X; B- 6 dias de cultivo 20000X; C- 9 dias de cultivo 20000X; D-12 dias de cultivo 14000X. Produtos de marcação citoquímica (▶) 53

RESUMO

O perfil de crescimento e o consumo de fosfato e glicose, bem como o conteúdo de fósforo, a distribuição, estrutura e localização de polifosfato foram avaliados em *Cunninghamella elegans* cultivada em meios contendo diferentes concentrações de fosfato. Os resultados permitiram evidenciar a influência dessas concentrações sobre a produção de biomassa e o metabolismo do polifosfato no organismo estudado. A maior concentração de fosfato no meio de cultivo proporcionou maior rendimento da biomassa ao longo do crescimento. Observou-se uma relação entre consumo de fosfato e glicose com o crescimento e a quantidade de polifosfato total nos micélios cultivados em diferentes concentrações de fosfato. Diferentes frações do polifosfato celular de *C. elegans* foram identificadas e quantificadas através de extrações seqüenciais. A citoquímica ultraestrutural foi utilizada, com sucesso, para identificar a localização e a distribuição de polifosfato em *C. elegans*. Os resultados revelaram diferenças no padrão de marcação citoquímica nas diferentes fases do crescimento e meios de cultivo. Uma marcação uniforme do polifosfato foi observada sobre a superfície celular, em especial, na parede celular e na membrana citoplasmática. Produtos de reação, resultantes da marcação citoquímica, foram também visualizados em estruturas trabeculares, vacuolares e vesiculares, sob a forma de corpos eletrondensos e grânulos dispersos no citoplasma. Os resultados demonstraram o potencial de *C. elegans* na acumulação de polifosfato, sugerindo uma possível aplicação em processos biotecnológicos.

Palavras Chave: Polifosfato, Zygomycetes, *Cunninghamella elegans*, Citoquímica Ultraestrutural.

ABSTRACT

The growth profile, phosphate and glucose uptake, phosphorus content, and polyphosphate distribution, structure and location were evaluated in *Cunninghamella elegans* grown in media containing different phosphate concentrations. The results showed a significant influence of the concentration of phosphate on biomass production and polyphosphate metabolism. The highest phosphate concentration induced the best yields of biomass. A correlation among phosphate and glucose uptake, growth and total polyphosphate content in the mycelia and the medium phosphate concentration was observed. Cellular fractions of Polyphosphate were identified and determined by using sequential extraction procedures. The ultrastructural cytochemistry was used successfully to analyze the polyphosphate location and distribution in *C. elegans*. The results revealed differences on the pattern of reaction products deposition in the mycelia according to the cellular growth phase and phosphate concentration in the culture medium. A uniform polyphosphate labeling was observed on the cellular surface, particularly cell wall and cytoplasmic membrane. Reaction products were visualized in intracellular structures, in the form of trabecules, vacuoles and vesicles, electron-dense bodies and dispersed granules in the cytoplasm. The results obtained in this study reveal the potential of *Cunninghamella elegans* for polyphosphate accumulation, and suggest its possible application in biotechnological processes.

Key Words: Polyphosphate; Zygomycetes; *Cunninghamella elegans*; Ultrastructural Cytochemistry.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de polifosfato em um grande número de organismos, desde bactérias a células de mamíferos, sugere uma função biológica fundamental à vida, sendo esta dependente da sua quantidade, localização celular, tamanho da cadeia e fonte biológica. Dentre as funções podem ser citadas: reserva de fosfato e energia; estoque e quelação de metais; formação de canais de membrana; participação no transporte de fosfato; envolvimento na função e formação do envelope celular; controle da atividade gênica, regulação da atividade enzimática e uma função vital em respostas celulares ao “stress” ambiental e na adaptação a fase estacionária de crescimento (Wood e Clarck, 1988; Kulaev e Kulakovskaya, 2000; Kumble e Kornberg, 1995; Kornberg et al., 1999).

Os distintos processos que resultam no acúmulo de polifosfato pelos microrganismos, e que podem ser induzidos por fatores ambientais, têm várias implicações biotecnológicas, médicas e industriais. Um desses processos envolve o acúmulo de polifosfato por microrganismos submetidos a ciclos anaeróbicos/aeróbicos alternados. Este fenômeno é a base do processo de tratamento de efluentes contaminados com fosfato, designado de “remoção melhorada de fosfato biológico”. Além disso, organismos com habilidade de acumular polifosfato podem ser utilizados na biorremediação de efluentes contaminados com metais pesados, haja vista, vários estudos demonstrarem a associação de grânulos de polifosfato com cátions e metais pesados. Em adição, a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência ou tolerância de alguns microrganismos a metais pesados reforça o seu potencial biotecnológico na remoção destes elementos (Kulaev, 2000; Keasling et al., 2000; Mino et al., 1998; Van Loosdrecht et al., 1997).

Dentre as classes de fungos, os Zygomycetes possuem grande importância econômica devido à participação em processos de biodeterioração (atacando materiais de diversas origens como couro, plástico, madeira e alimentos), biodegradação (principalmente na reciclagem de lixo e formação de adubo), biorremediação e em processos industriais, produzindo enzimas como lipases, proteases, amilases e vários ácidos, como por exemplo o lático, cítrico e fumárico, os quais funcionam como acidulantes na indústria de laticínios (Carlile e Watkinson, 1996; Herrera e Ulloa, 1998).

A literatura revela um crescente aumento dos estudos com espécies do gênero *Cunninghamella*, considerando sua habilidade de metabolizar compostos xenobióticos através da secreção de hidrolases. Dessa forma, esses organismos são estudados em função de sua potencialidade nos processos de biodegradação e biotransformação (Reddy et al., 1990; Foster et al., 1991; Pothuluri et al., 1992; Schwartz et al., 1996; Zhang et al., 1996a; 1996b; Lamacka e Sajbidor, 1998; Pothuluri et al., 1998a, 1998b).

Apesar das inúmeras funções biológicas relatadas para o polifosfato nos organismos avaliados, a sua exata função fisiológica permanece incerta. Adicionalmente, considerando-se todos os aspectos abordados, especificamente a influência das condições ambientais sobre a ativação e a regulação do metabolismo do polifosfato, é fundamental o desenvolvimento de estudos relativos ao comportamento desse polímero em eucariotos. Paralelamente, a utilização de fungos como modelos para a biologia celular dos eucariotos é bastante promissora. A relatada importância e o potencial dos Zygomycetes em diferentes áreas justificam a utilização de espécies da classe para a avaliação da influência de fatores ambientais no comportamento bioquímico e citoquímico do polifosfato, o que certamente culminará com o fornecimento de dados a respeito do seu papel nas respostas de adaptação durante o crescimento e desenvolvimento de um organismo eucariótico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. POLIFOSFATO

O Polifosfato é um polímero linear formado por resíduos de ortofosfato, unidos por ligações fosfoanidrílicas, termodinamicamente equivalentes ao fosfato de alta energia do Tri-Fosfato de Adenosina (ATP). Por ser um composto energético e estruturalmente mais simples do que o ATP, o polifosfato é considerado um precursor do ATP na evolução bioquímica (Harold, 1966; Kulaev et al., 2000).

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

O metabolismo do polifosfato é mantido por diferentes grupos de enzimas, responsáveis pelo equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação, de modo que qualquer interferência nesse balanço resulta em um acúmulo ou na degradação total deste polímero pela célula. A enzima chave do metabolismo do polifosfato é a polifosfatocinase, a qual catalisa a reação de transferência, reversível, do fosfato gama do ATP para o polifosfato, atuando como uma ponte entre os dois compostos ricos em energia. A presença dessa enzima em eucariotos ainda é muito controversa. Por outro lado, a degradação do polifosfato é mediada por exopolifosfatases, endopolifosfatases e cinases específicas. As exopolifosfatases e endopolifosfatases catalisam a hidrólise de ligações fosfoanidrílicas

terminais e internas, respectivamente, além de possuírem especificidade para o tamanho da cadeia do polímero. Dentre as cinases específicas conhecidas, a polifosfatoglicocinase e a polifosfatofrutocinase, a mais estudada e encontrada entre os microrganismos é a polifosfatoglicocinase, que catalisa a reação de fosforilação da glicose usando o polifosfato como fonte de fósforo e produz glicose-6-fosfato (Kuroda e Kornberg, 1997; Shiba et al., 2000; Tzeng e Kornberg, 2000; Wood e Clark, 1988; Bolesch e Keasling, 2000; Kumble e Kornberg, 1996).

O comportamento dinâmico do polifosfato, o seu acúmulo e consumo, são os aspectos mais notáveis de seu metabolismo em microrganismos. O desequilíbrio entre síntese e degradação resulta em variações, entre cem e mil vezes, na sua concentração final. Em geral, a quantidade de polifosfato durante a fase exponencial de crescimento é baixa, elevando-se no início da fase estacionária. No entanto, o acúmulo do polifosfato em resposta ao estresse ambiental imposto por limitações nutricionais, variações de pH, osmolaridade e tensão de oxigênio têm sido descritas em inúmeros microrganismos, principalmente bactérias e leveduras (Harold, 1966; Kuroda e Ohtake, 2000; Mcgrath e Quinn, 2000; Barak e Rijn, 2000; Rao et al., 1998; Rao e Kornberg, 1996).

Um fenômeno interessante de acúmulo de polifosfato estabelecido em leveduras e bactérias, chamado de hipercompensação, ocorre quando células previamente submetidas à ausência de fosfato, são posteriormente incubadas em meio contendo fosfato. Este tratamento induz um rápido e intenso acúmulo de resíduos de fosfato sob a forma de polifosfato, o qual torna-se o mais abundante composto de fósforo da célula, cuja concentração pode alcançar até 20% do peso seco celular (Figura 1) (Harold, 1966; Kuroda e Ohtake, 2000).

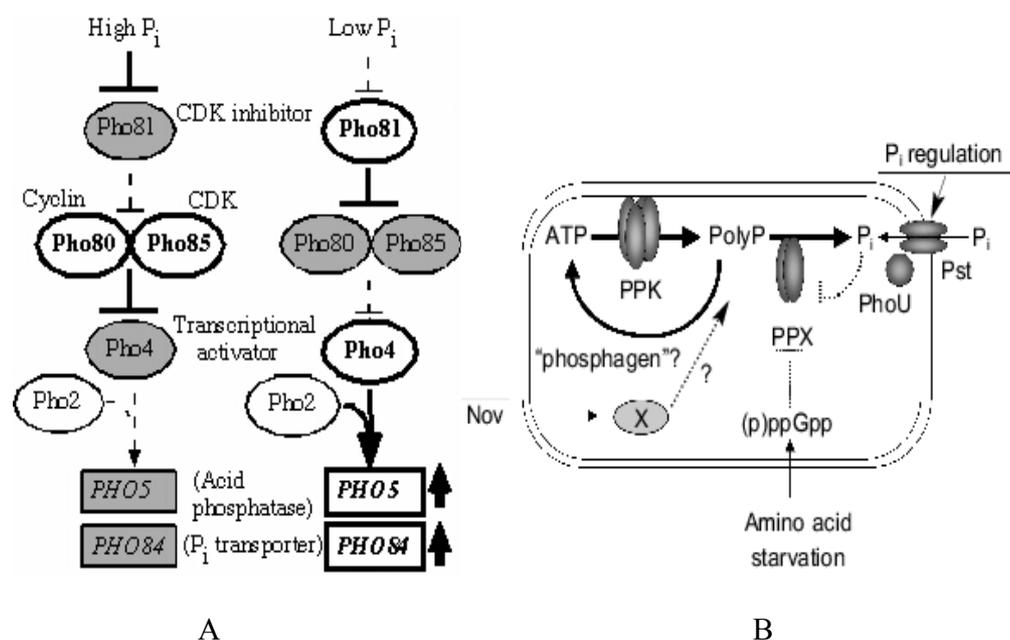


Figura 1. Modelos propostos para a regulação do metabolismo do polifosfato (Johnson e Carlson, 1992 (A); Oshima 1997 (B))

Por outro lado, estudos recentes mostraram que uma mutação no gene que codifica a polifosfatocinase, responsável pela síntese do polifosfato, influencia a motilidade de bactérias patogênicas. Tendo em vista que a motilidade é essencial para a invasão e o estabelecimento da infecção em um hospedeiro, tal resultado sugere uma relação entre polifosfato e patogenicidade bacteriana. Adicionalmente, a presença da polifosfatocinase em muitas bactérias patogênicas e sua ausência em eucariotos, a tornam um alvo em potencial para drogas antimicrobianas. Paralelamente, o polifosfato de cadeia longa apresenta atividade bactericida e bacteriostática quando testado contra *Bacillus cereus*. Entretanto, esses efeitos antimicrobianos dependem da concentração do polifosfato e da fase de crescimento da célula, visto que, células na fase estacionária de crescimento não foram afetadas (Rashid et al., 2000 ; Rashid e Kornberg, 2000a e 2000b).

Em bactérias verificou-se o efeito da concentração de fosfato do meio de cultivo sobre o crescimento e, conseqüentemente, sobre a habilidade de acumulação do polifosfato celular. Adicionalmente, foram observadas variações em relação à fase de crescimento celular (Smirnov et al., 2002).

Classicamente, os grânulos contendo polifosfato (grânulos de volutina ou metacromáticos) foram identificados no início do século XX, com a aplicação da microscopia óptica. A partir de então, o polifosfato tem sido estudado com o emprego de diversas técnicas, como por exemplo, microanálise por Raios X, ressonância nuclear magnética, métodos diferenciados de extração bioquímica e cromatografia (Beever e Burns, 1977; Urech et al., 1978; Campos Takaki et al., 1983; Greenfield et al., 1987; Poolman et al., 1987)

2.2. FUNGOS: CLASSE ZYGOMYCETES

Os Zygomycetes e os Trichomycetes constituem as duas Classes do Filo Zygomycota (Alexopoulos et al., 1996).

A classe Zygomycetes é constituída por espécies saprofíticas, simbiontes, parasitas facultativos de animais, bem como, parasitas obrigatórios de animais e vegetais, inclusive de outros Zygomycetes. As espécies do grupo podem ser isoladas a partir de vários substratos, tais como, solo, estrume, frutas, flores, grãos estocados, cogumelos, assim como de amostras de invertebrados e vertebrados, incluindo os seres humanos Levy et al., 1986; Alexopoulos et al., 1996).

O desenvolvimento pleno dos Zygomycetes ocorre na faixa de temperatura que vai de 25° a 30°C, sendo a faixa de temperatura máxima de crescimento de 42° a 58°C, de acordo com a espécie (Weitzman et al., 1995). Alguns gêneros da ordem Mucorales são dimórficos, estando o dimorfismo relacionado às condições ambientais, como anaerobiose,

presença de substâncias que bloqueiam a função geradora de energia das mitocôndrias e adição de Adenosina Mono Fosfato Cíclico (AMPc) (Orlowski, 1991).

Os referidos fungos são capazes de se desenvolver nas mais diversas condições de aeração: no ar, na presença de oxigênio, em condições microaerofílicas e em atmosfera de dióxido de carbono (Lehrer et al., 1980). A reprodução ocorre pela formação de esporos de origem sexuada e assexuada (Alexopoulos et al., 1996).

Por outro lado, dentre os Zygomycetes, os representantes dos Mucorales são considerados patógenos oportunistas para hospedeiros imunocomprometidos, com lesões como queimaduras e submetidos a antibioticoterapia. Entretanto, já existem relatos de zigomicoses pulmonares em hospedeiros teoricamente saudáveis. As infecções severas desenvolvidas por Zygomycetes podem ser fatais e as manifestações clínicas são representadas pelos seguintes quadros da zigomicose: sistêmica; gastro-intestinal; cutânea; amplamente disseminada e miscelânea (Lehrer et. al., 1980; Weitzman et al., 1995).

Sendo assim, os Zygomycetes são organismos com grande potencial econômico-industrial e na medicina. Além disso, sua habilidade de adaptação a diferentes condições ambientais, resultado de variações em suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representa um elemento fundamental na compreensão de seu comportamento celular, com vistas à identificação de mecanismos específicos de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência (Griffin, 1994; Carlile e Watkinson, 1996).

2.3. GÊNERO *Cunninghamella*

O gênero *Cunninghamella* Matruchot (1903) é um dos mais comuns nos Mucorales. As espécies do gênero são geralmente encontradas no solo e outros substratos orgânicos. Representantes exibem colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforos eretos, ramificados e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangióolos. O micélio quando jovem não exibe septo. A septação está associada à idade da cultura (Baijal e Mehrotra, 1980; Domsch et al., 1980).

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

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 macroscópicos e fenotípicos diferenciados. O mesmo ocorre com variações de temperatura e umidade. Esse tipo de comportamento é muito comum em fungos (Alexopoulos et al., 1996).

De um modo geral, os aspectos morfológicos correspondem a elementos fundamentais na identificação dos fungos. Do ponto de vista taxonômico, espécies de *Cunninghamella* podem ser identificadas por sua habilidade em responder a variações no meio de cultivo. Contudo, a separação das espécies é complexa e alguns estudos foram realizados para identificar caracteres de valor taxonômico como, por exemplo, a forma do esporangióolo analisada por microscopia óptica (O'Donnel, 1979; Shipton e Lunn, 1980; Alexopoulos et al., 1996; Carlile e Watkinson, 1996).

Alguns autores realizaram estudos relevantes sobre a variabilidade e morfologia de espécies/isolados de *Cunninghamella* e espécies intimamente relacionadas, descrevendo, ilustrando, posicionando taxonomicamente e elaborando chaves para a identificação. Atualmente, a separação das espécies também é definida com base na temperatura de crescimento. Dados sobre aspectos que possam contribuir com a identificação das espécies e isolados devem ser analisados com uma estratégia para o posicionamento taxonômico (Baijal e Merhotra, 1980; Domsch, 1980; Shipton e Lunn, 1980; Trufem, 1981).

Os fungos são organismos com extrema versatilidade de respostas relativas à adaptação em função de condições ambientais e exibem grande potencial em inúmeros processos biotecnológicos, importância industrial, além de sua importância médica. Paralelamente, por serem organismos eucariotos, os fungos representam modelos de estudo em diferentes áreas da biologia celular, genética, fisiologia e bioquímica (Carlile e Watkinson, 1996, Alexopoulos et al., 1996).

2.4. ULTRAESTRUTURA

Sob o ponto de vista estrutural, os fungos são organismos eucarióticos e, portanto exibem citologicamente, os caracteres comuns desse grupo de organismos, sendo de modo geral, 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. Aspectos da esporangiosporogênese, morfologia e germinação de esporos de espécies de *Rhizopus*, *Mucor rouxii*, *Gilbertela persicaria* e *Mycotypha sp.* foram observados de maneira mais evidente (Hawker e Abbot, 1963; Bartinicki-Garcia., 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 Raios 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 (San-Blas, 1982; Klomparens, 1990; Collins et al., 1993).

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 taxonomia 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 e 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 e Katsurashima, 1993; Edelman e Klomparens 1995a, 1995b ; Jones et al., 1996; Mckeown et al. 1996).

A citoquímica é um método que permite a geração de informações sobre a localização **in situ** de moléculas, bem como uma visualização da distribuição e comportamento dessas moléculas, o que permite uma correlação entre as diferentes atividades bioquímicas e fisiológicas. Os resultados obtidos com a citoquímica combinados com dados obtidos por outras metodologias conduzem à elucidação das funções, atividades

e estado metabólico de diferentes compartimentos celulares (Hayatt, 1989; De Souza, 1998; Klomparens, 1990).

Proteínas, ácidos nucléicos, açúcares, lipídeos e fosfatos são constituintes moleculares de todos os organismos vivos. Contudo, sua composição, localização e estrutura podem variar, gerando moléculas altamente diferenciadas em organismos distintos. Os processos de crescimento, maturação e diferenciação celular são complexos e coordenados e envolvem muitos componentes celulares. Modificações químicas e estruturais que ocorrem na organização celular podem sinalizar diferentes estágios de maturação de um organismo. Dessa forma, a atividade de moléculas e seus tipos podem ser analisados citoquimicamente em função do desenvolvimento de um organismo (Smith et al., 1977; Garraway e Evans, 1984; Griffin, 1994; Rivero e Cerdá-Olmedo, 1994; Hayatt, 1989; De Souza, 1998; Klomparens, 1990).

A detecção de polifosfato pela técnica citoquímica foi desenvolvida por Ebbel et al., 1958 em diversos organismos como bactérias, fungos, protozoários e algas.

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, a formação de estruturas reprodutivas e a diferenciação sexual. Tais condições exibem influência sobre a estrutura fina dos organismos (Garraway e Evans, 1984; Griffin, 1994; Aoki e Nirenberg, 1999; Kana-Uchi e Fukatsu, 1999; Kihara et al., 1999; Kitamoto et al., 1999; Tham et al., 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Considerando os poucos relatos que avaliam o potencial acumulativo de polifosfato e sua citoquímica, bem como o valor agregado desse polímero, os estudos realizados visaram ampliar o conhecimento fisiológico, bioquímico e ultraestrutural associados ao metabolismo do polifosfato durante o crescimento de *Cunninghamella elegans*.

3.2. ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o efeito do conteúdo de fosfato inorgânico no meio de cultivo sobre crescimento de *C. elegans*;
- 2- Avaliar o comportamento fisiológico relativo ao consumo de glicose e fosfato inorgânico do meio de cultura durante o crescimento de *C. elegans*.
- 3- Determinar as variações quantitativas e qualitativas do polifosfato durante o processo de crescimento de *C. elegans*;
- 4- Analisar o comportamento ultraestrutural e citoquímico do polifosfato ao longo do crescimento de *C. elegans*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. MICRORGANISMO

Foi utilizada a amostra de *Cunninghamella elegans* IFM 46109, procedente do Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japão, depositada 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 MANUTENÇÃO E ESPORULAÇÃO

O meio BDA – Batata Dextrose Agar foi utilizado para manutenção e esporulação da amostra durante o experimento.

D-Glicose.....	20g
Infusão de Batata.....	200g
Agar	17g
Água destilada.....	1000 mL

O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, sendo o pH final 5,6.

4.1.2.2. MEIO DE CRESCIMENTO

O meio SMM - Synthetic Medium for Mucorales, descrito por Hesseltine e Anderson (1957), foi utilizado para o crescimento da amostra durante o experimento. A composição do meio é apresentada a seguir:

D-Glicose.....	40g
Asparagina.....	2g
Fosfato de potássio monobásico.....	0,5g
Sulfato de magnésio heptahidratado....	0,25g
Cloridrato de Tiamina.....	0.5mg
Água destilada.....	1000mL

O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, sendo o pH final 5,9. Este meio recebeu a denominação de SMM1, para distinguí-lo de outros (SMM2 e SMM3) onde se alterou a concentração de fosfato inorgânico :

- Meio SMM2 – Meio modificado pela adição de 2,5 g/L de fosfato de potássio
- Meio SMM3 – Meio sem fosfato de potássio.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1.1. PRÉ-INÓCULO

Amostra de *Cunninghamella elegans* foi inoculada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio BDA (item 4.1.2.1) e incubada a 28°C como forma de manutenção. Em paralelo, amostras foram cultivadas nas mesmas condições anteriores durante 4 dias. Após esse período, os esporos foram coletados, com o uso de cotonetes, previamente esterilizados e umedecidos em água destilada estéril, sendo determinado o número de esporos em câmara de Neubauer. Aliquotas de 1 ml de suspensão de esporos contendo 10^8 esporos/mL foram utilizadas como pré-inóculo.

4.2.1.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Aliquotas de 1 ml do pré-inóculo foram inoculadas em Erlenmeyers com capacidade para 250 ml, contendo 100 mL dos meios SMM1, SMM2 e SMM3 (item 4.1.2.2). Em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação orbital de 150 rpm, a 28°C por um período de doze dias. Amostras foram coletadas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo para determinação da curva de crescimento, avaliação do conteúdo do polifosfato e estudos ultraestruturais. A partir do líquido metabólico foi realizada a determinação do pH e do consumo de glicose e fosfato.

4.2.1.3. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

O micélio coletado durante os intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo foi lavado por duas vezes com água destilada, e submetido ao processo de liofilização, sendo posteriormente mantido em dessecador a vácuo até peso constante.

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

4.2.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH dos meios de cultura após a inoculação do fungo foi realizada por potenciometria nas amostras coletadas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias. O valor do pH em cada ponto do intervalo foi a média de três aferições.

4.2.2.2. DETERMINAÇÃO DE FOSFATO

O consumo de fosfato do meio de cultura foi determinado por método colorimétrico (“Kit” Biosystems), que se baseia na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, resultando em um complexo fosfomolibdato que é quantificado espectrofotometricamente a 340 nm, nas amostras do líquido metabólico coletados nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo.

Uma curva padrão foi elaborada, utilizando-se uma solução de fósforo na faixa de 0,5 – 5,0 mg/dL. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, Spectronic, modelo Genesys 2, com leitura no espectro do ultravioleta.

4.2.2.3. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A determinação de glicose foi realizada pelo método enzimático colorimétrico (Celm), que se fundamenta na oxidação enzimática da glicose presente nas amostras dos sobrenadamentos de cultura coletados nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo, pela enzima glicose-oxidase.

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

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.

4.2.2.4. EXTRAÇÃO DE POLIFOSFATO TOTAL

O polifosfato celular total foi extraído e determinado a partir da biomassa obtida das amostras de *C. elegans* pelo método descrito por McGrath & Quinn (2000), modificado.

Amostras com 20 mg de micélio (peso seco), oriundas dos meios com diferentes concentrações de fosfato, coletadas nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo, foram lavadas duas vezes em solução de NaCl 1,5M contendo EDTA 0,01M e NaF 1mM. Posteriormente, foram homogeneizadas e sonicadas em 3 mL da solução de lavagem, em banho de gelo, por 10 períodos de 2 minutos com intervalos de 2 minutos a 16 KHz. O extrato resultante foi centrifugado a 12.000xg, durante 5 minutos para remoção dos fragmentos celulares.

Para determinar o conteúdo de polifosfato intracelular total, 100µL de HCl concentrado foi adicionado a 0,5 ml do extrato celular e aquecido a 100° C por 45 minutos. O fosfato liberado foi dosado utilizando-se o método descrito no item 4.2.2.2.

As concentrações de polifosfato celular total nas amostras foram expressas em miligramas de fosfato por miligrama de biomassa seca e dadas como média de triplicatas. Uma amostra não hidrolizada foi utilizada como controle para determinar o nível de fosfato livre da célula.

4.2.2.5. EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DO POLIFOSFATO

A extração sequencial do polifosfato a partir da biomassa obtida de *C. elegans* foi realizada pelos métodos descritos por Dietrich (1976) e Smirnov et al. (2002), modificados, como apresentado na Figura 2.

Amostras de 100mg de micélio (peso seco) foram homogeneizadas em 5mL de água deionizada a 0° C por 10 minutos, sonicadas em banho de gelo, por 8 minutos, intermitentemente a 16 KHz e posteriormente centrifugadas a 12.000xg, durante 5 minutos para remoção dos fragmentos celulares. O sobrenadante obtido correspondeu a **fração 1** do polifosfato. O precipitado foi submetido ao processo de extração com NaOH 0.05N a 0°C por 30 minutos e a **fração 2** foi obtida por centrifugação. Em seguida, o precipitado obtido anteriormente, foi tratado com ácido perclórico - HClO₄ 0.5N a 90°C por 30 minutos, sendo separado o sobrenadante, obtido e denominado **fração 3**.

O conteúdo do fósforo lábil e ortofosfato foram determinados nas três frações. A quantidade de fósforo lábil foi determinado pela diferença do conteúdo do fosfato antes e após a hidrólise em HCl 1N a 100°C por 10 minutos. O fósforo lábil foi considerado como polifosfato.

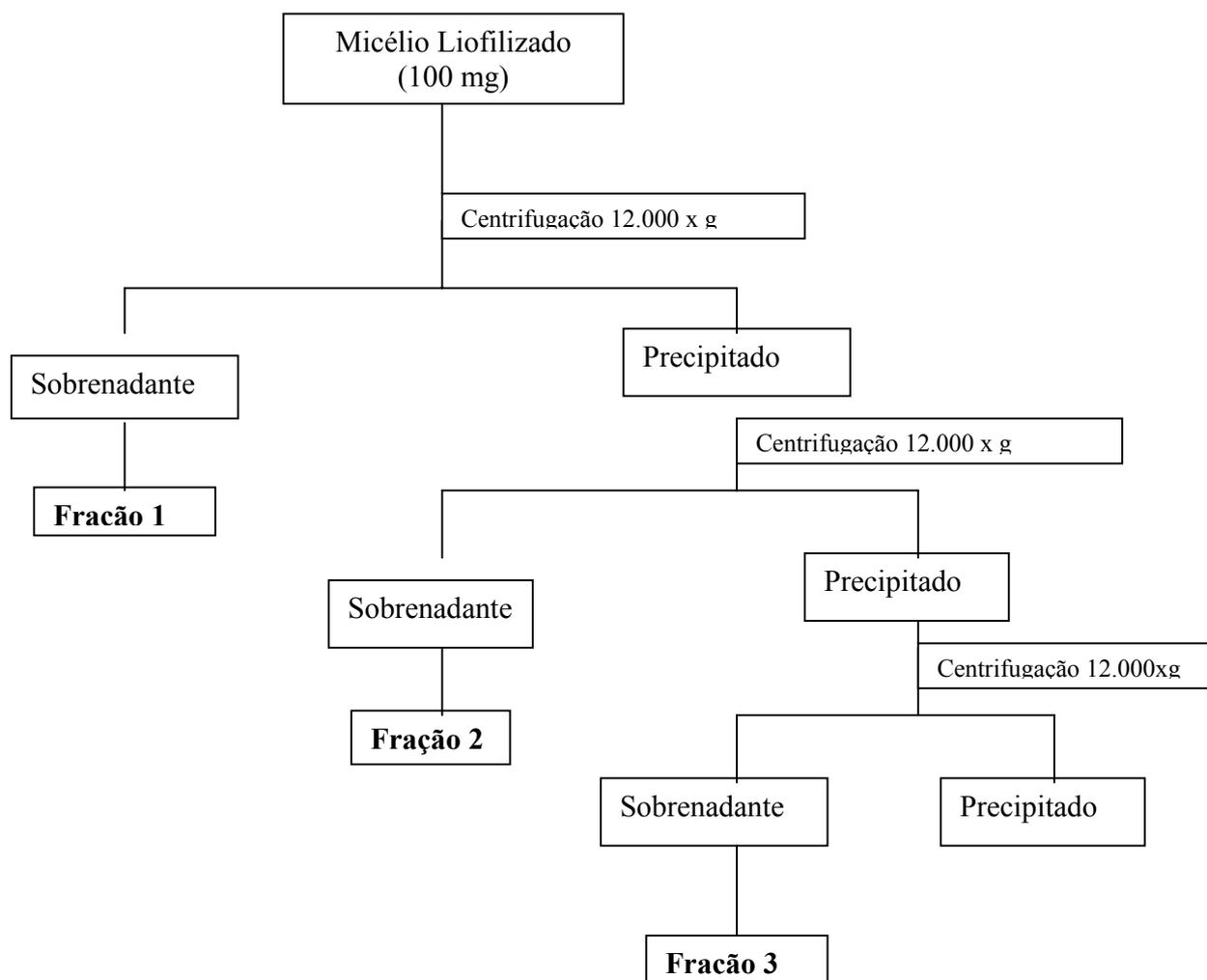


Figura 2. Esquema da extração sequencial do polifosfato

4.2.3. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL

4.2.3.1. TÉCNICA DE ROTINA

A biomassa coletada nos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de crescimento, oriundas dos distintos meios de cultura, foi lavada em salina tamponada, pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos de acordo com o método descrito por De Souza (1998). Em seguida foi fixada com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora, a temperatura de 25°C.

Finda a etapa de fixação, todas as amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato, durante 10 minutos. Seguiu-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato 0,1 M, durante 1 hora a temperatura ambiente, em condições de escuridão. Em seguida as amostras foram mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente desidratadas.

Para desidratação das amostras foi utilizada acetona, em proporções de 50%, 70%, 90% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Seguiu-se a embebição com misturas de acetona e resina epoxi, nas concentrações de 2:1, 1:1, 1:2 (6 horas em cada etapa) e finalmente resina epoxi pura durante 12 horas. O emblocamento foi realizado com resina epoxi pura, sendo a polimerização total atingida pela incubação em estufa de 60°C, durante 72 horas.

Após a polimerização, os blocos foram submetidos a ultramicrotomia, para obtenção de cortes ultrafinos, os quais foram depositados em grades de cobre com 300 mesh. As grades contendo as amostras foram observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

4.2.3.2. CITOQUÍMICA PARA POLIFOSFATO

Após a coleta, amostras de *C. elegans* correspondentes aos intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias de crescimento foram submetidas ao método descrito por Ebbel et al., (1958) para a citoquímica do polifosfato. As amostras foram lavadas em água destilada por duas vezes durante 10 minutos. Em seguida fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6.5 durante 1 hora, a temperatura de 4°C.

Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, foram incubadas para detecção de fosfato, primeiramente em nitrato de chumbo 2%, pH 3.4, por 4 horas, a 4°C, e posteriormente em sulfeto de amônia, 1% por 30 minutos, a temperatura de 4°C. Ao término do período de incubação as amostras foram novamente lavadas com água destilada por três vezes rápidas.

A etapa seguinte foi a pós-fixação, com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6.5 durante 1 hora a temperatura de 4°C. Em seguida as amostras foram novamente lavadas por mais três vezes.

A partir desta etapa, as amostras foram submetidas aos mesmos processos de desidratação, embebição, emblocamento, corte e observação com obtenção de micrografias citadas na técnica de rotina. As amostras controle foram tratadas com ácido tricloroacético 10% antes da incubação com o meio para revelação do polifosfato (nitrato de chumbo 2% pH 3.4 e sulfeto de amônia 1%).

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ORTOFOSFATO SOBRE O CRESCIMENTO DE *Cunninghamella elegans*

As figuras 3, 4 e 5 mostram a influência de diferentes concentrações de ortofosfato disponível nos meios SMM1, SMM2 e SMM3 sobre o crescimento de *C. elegans*.

Os resultados para o crescimento de *C. elegans* cultivada no meio SMM1, cuja concentração de ortofosfato (Pi) é 0.5g/L estão apresentadas na Figura 3 .

Uma análise da curva de pH permite observar que a partir da inoculação dos esporos o mesmo decresce de forma contínua, até o final do cultivo, atingindo o valor de 3.8 (Figura 3A)

A análise da Figura 3B-C permite verificar que houve crescimento logarítmico da cultura durante os três primeiros dias de cultivo. Após esse período, o crescimento continuou, atingindo a biomassa máxima correspondente a 3.18 g/L no décimo segundo dia.

O consumo total (100%) do fósforo adicionado ocorreu durante os três primeiros dias de cultivo (Figura 3B) .

Em relação à glicose verificou-se o consumo de 41% nos três primeiros dias de crescimento; ao término do cultivo, com maior rendimento de biomassa, 55% da glicose adicionada foi utilizada para o desenvolvimento da cultura (Figura 3C).

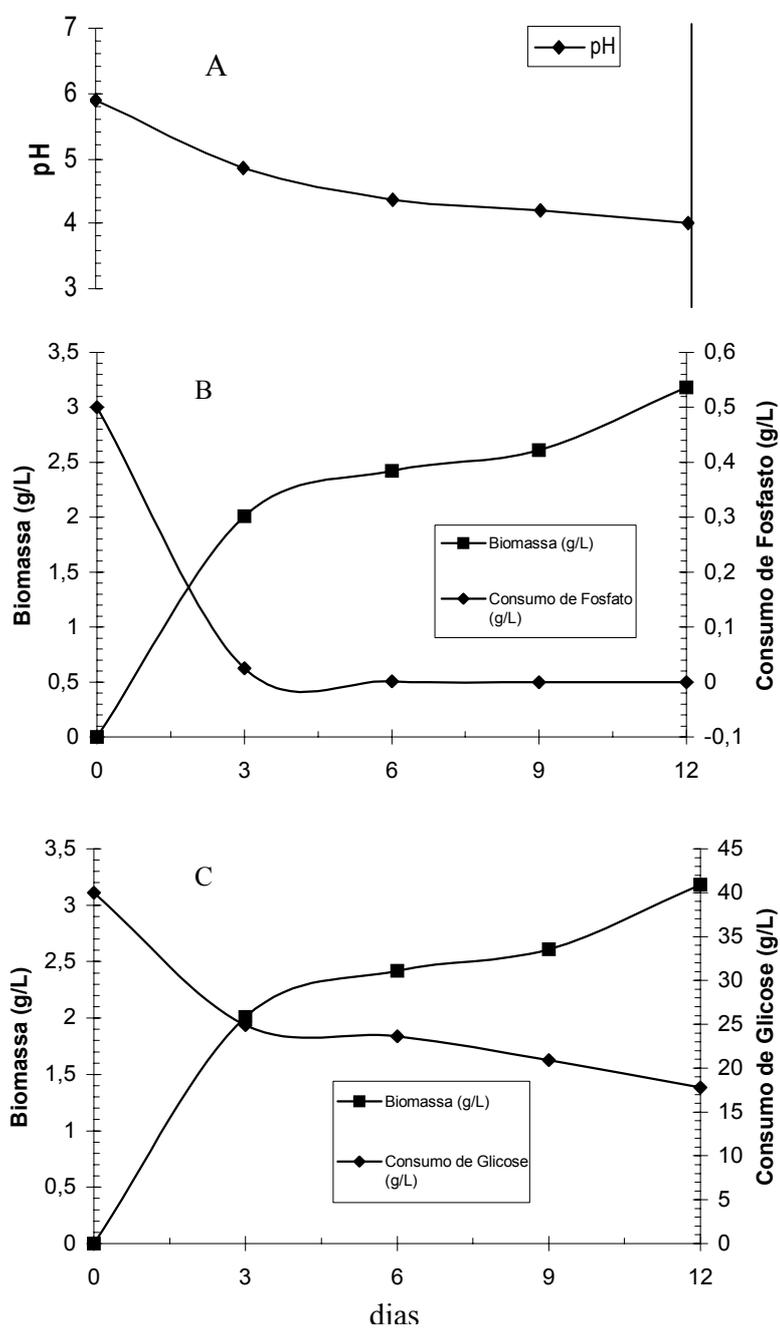


Figura 3. Perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* cultivada no meio SMM1: pH do meio (A); crescimento e consumo de fosfato (B); crescimento e consumo de glicose (C).

Na presença de 2.5 g/L de fosfato (meio SMM2) observou-se linearidade em relação ao pH até o terceiro dia de cultivo. A partir desse intervalo, os valores decaíram progressivamente até o final do cultivo, atingindo 4.6 (Figura 4A).

Ao mesmo tempo, observou-se produção logarítmica de biomassa até o terceiro dia de cultivo, ocorrendo posteriormente um fenômeno de diauxia até o sexto dia, a partir do qual um novo incremento de biomassa ocorreu até o décimo segundo dia, atingindo um rendimento máximo de 3.29 g/L.

Considerando, o consumo de fosfato do meio de cultivo verificou-se que durante os três dias iniciais de crescimento 95% do fosfato adicionado foi utilizado por *C. elegans* (Figura 4B).

Por outro lado, o consumo de glicose permite verificar a utilização de 45% do conteúdo inicial até o terceiro dia de cultivo. Ao final do período experimental, 56% da glicose foi consumida pela cultura, confirmando o fenômeno de diauxia, ou seja, parada da utilização de nutrientes e quase estabilização do conteúdo remanescente (Figura 4C).

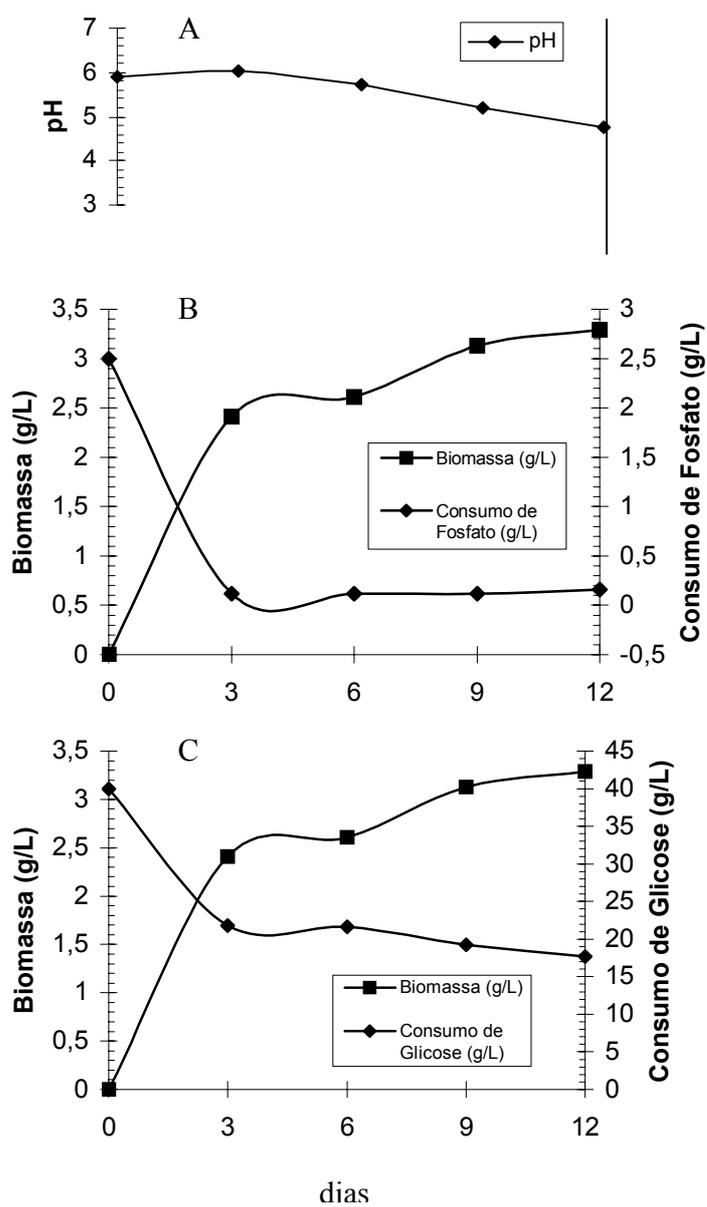


Figura 4. Perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* cultivada no meio SMM2: pH do meio (A); crescimento e consumo de fosfato (B); crescimento e consumo de glicose (C).

Com relação aos resultados do crescimento em meio SMM3, caracterizado pela ausência de fosfato, observou-se valores constantes de pH até o sexto dia de cultivo, seguido por um aumento discreto, atingindo o valor de 6.1 no décimo segundo dia de crescimento (Figura 5A).

A análise da curva de crescimento permite verificar o aumento progressivo da biomassa, atingindo valor máximo de 0.24 g/L no décimo segundo dia de cultivo.

O consumo de glicose correspondeu apenas a 30% no terceiro dia de cultivo e comportamento linear até o décimo segundo dia (Figura 5B). Tal fato é explicado pela dificuldade de consumo da glicose, tendo em vista a ausência de fosfato quando comparado ao crescimento nos meios SMM1 e SMM2.

Uma análise comparativa do crescimento, determinada através da biomassa, permite verificar uma variação significativa no crescimento de *C. elegans* nas culturas com e sem fosfato.

Verifica-se, adicionalmente, uma correlação linear entre o crescimento, consumo de glicose e consumo de fósforo nos meios SMM1 e SMM2.

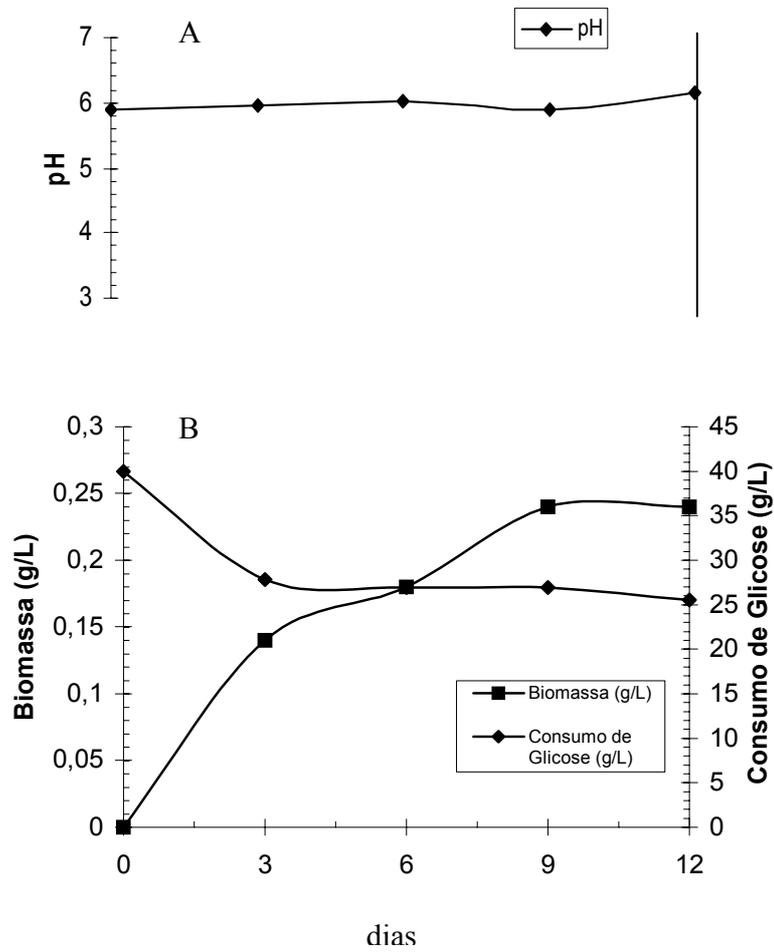


Figura 5. Perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* cultivada no meio SMM3: pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B).

5.2. ACUMULAÇÃO DE FOSFATO POR *Cunninghamella elegans*

Polifosfato foi observado nas células de *C. elegans* mantido em meio com diferentes concentrações de fosfato e em diferentes estágios de crescimento.

Considerando que o cultivo de *C. elegans* em meio sem a presença de fosfato (SMM3) determinou pequena produção de biomassa, não foi possível avaliar o conteúdo de polifosfato neste meio.

A Figura 6 apresenta o comportamento fisiológico de *C. elegans* em relação à produção de biomassa e conteúdo de polifosfato em micélio no meio SMM1.

Com a análise das curvas de crescimento e conteúdo de polifosfato, observou-se aumento de polifosfato na fase exponencial, permanecendo linear até o sexto dia, com posterior decréscimo (figura 6A). Ao mesmo tempo, observa-se maior consumo de glicose e fosfato na fase exponencial (Figura 6B).

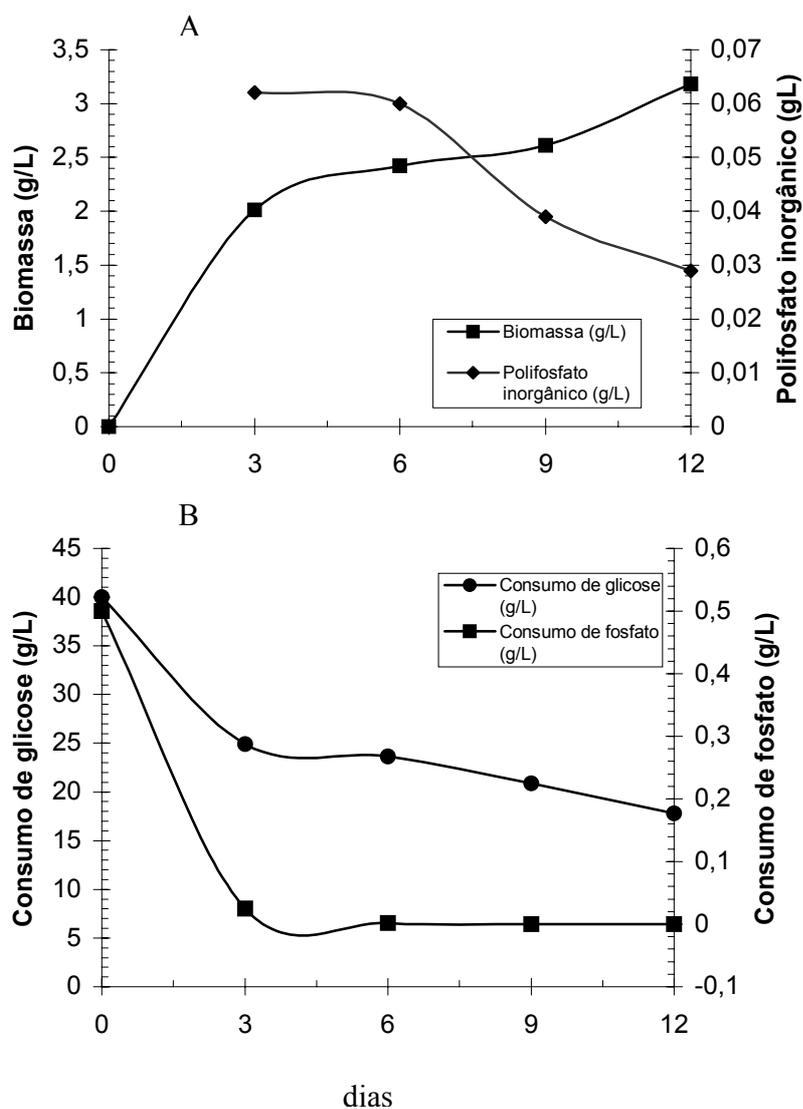


Figura 6. Curva de acumulação de polifosfato (A) relacionada ao consumo de fosfato e glicose (B) por *Cunninghamella elegans* no meio SMM1.

As curvas de crescimento e acumulação de polifosfato no micélio de *C. elegans* cultivada no meio SMM2 contendo 2.5 g/L de fosfato induziu aumento maior no conteúdo de polifosfato total no micélio de *C. elegans* (Figura 7).

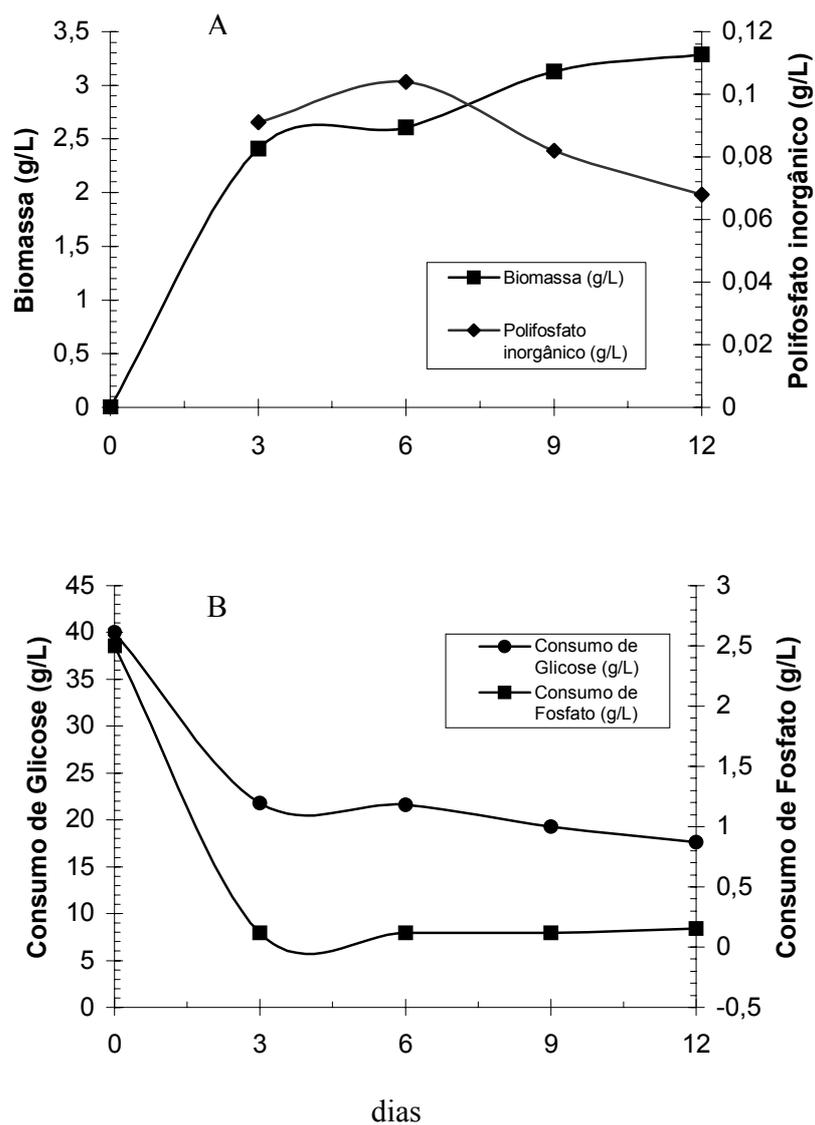


Figura 7. Curva de acumulação de polifosfato (A) relacionada ao consumo de fosfato e glicose (B) por *Cunninghamella elegans* no meio SMM2.

Quando *C. elegans* foi cultivado no meio SMM1 verificou-se um acúmulo máximo de polifosfato de 0,062g/L até o terceiro dia de cultivo. Em seguida, o conteúdo de polifosfato micelial diminuiu gradativamente chegando à concentração de 0.029g/L no último dia de cultivo.

No meio SMM2 o conteúdo máximo de polifosfato (0,1g/L) foi observado no sexto dia de crescimento e a partir deste período de tempo decresceu, atingindo a concentração de 0.068g/L no décimo segundo dia de crescimento. Os dados estão inversamente relacionados com os consumos de fosfato e glicose no meio, indicando que quanto maior o consumo de fosfato maior a acumulação de polifosfato.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DO POLIFOSFATO

O polifosfato detectado ao longo do crescimento foi ensaiado através de extração sequencial a partir da biomassa obtida de *C. elegans* em diferentes frações: solúvel em água (Fração 1), solúvel em base (Fração 2) e insolúvel em ácido (Fração 3) conforme descrito no item 4.2.2.5, das amostras cultivadas em meio SMM1 e SMM2, correspondentes aos intervalos de 6 e 12 horas de cultivo, considerados os pontos citados como valores máximo e mínimo, respectivamente, com base na determinação do polifosfato micelia total. A quantificação das frações foi determinada em função da biomassa produzida no final da fase exponencial (6 dias) e fase estacionária (12 dias) nos meios SMM1 e SMM2 (Figura 8A-B).

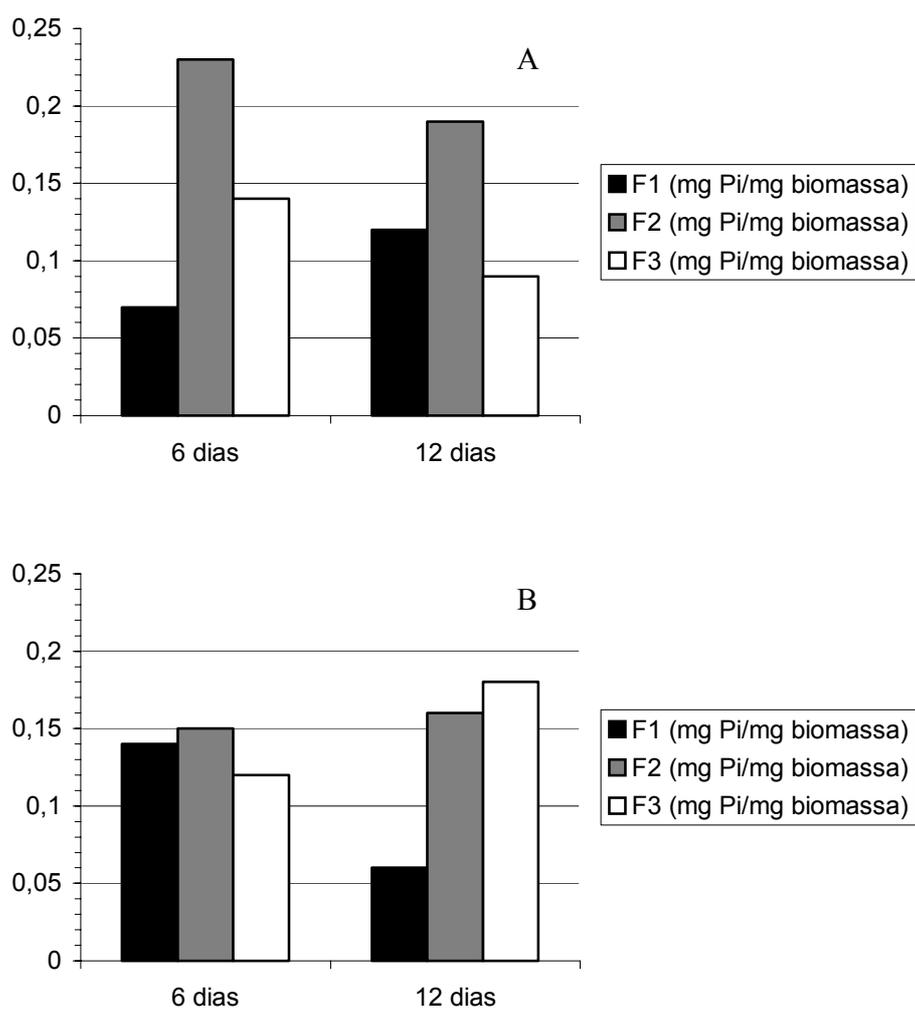


Figura 8. Perfil das frações de polifosfato obtidas através de extração sequencial da biomassa de *Cunninghamella elegans* cultivada nos meios SMM1 (A) e SMM2 (B). F1- Fração solúvel em água; F2- Fração solúvel em base; F3- Fração insolúvel em ácido.

A fração solúvel em água a 0° C (fração 1) nas amostras cultivadas em SMM1, variou em função do tempo de cultivo de *C.elegans*; a amostra com 12 dias de crescimento demonstrou valor superior em relação àquelas com 6 dias. Contudo, os valores obtidos para a fração solúvel em base e insolúvel em ácido perclórico foram maiores nas amostras com 6 dias de cultivo (Figura 8A).

Adicionalmente, o conteúdo de fósforo na fração solúvel em base (fração 2) foi maior que todas as outras frações, respectivamente, para os dias 6 e 12. A fração 3, insolúvel em ácido, correspondeu a 0,14 mg Pi no sexto dia de crescimento e 0,09 mg no décimo segundo dia.

Os conteúdos de fósforo da fração 1, da amostra com 6 dias de cultivo em meios SMM2 exibiu valores maiores que aqueles observados nas amostras com 12 dias de crescimento (Figura 8B). As frações 2 e 3, respectivamente solúvel em base e insolúvel em ácido, extraídas da biomassa com 6 dias, apresentaram conteúdos muito próximos. Por outro lado, com 12 dias de cultivo os conteúdos das frações 2 e 3 também apresentaram valores semelhantes, contudo, foram discretamente maiores do que na biomassa com 6 dias de cultivo.

5.4. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO POLIFOSFATO

Pela análise de rotina, as hifas de *C. elegans* cultivadas em meio SMM1 exibem diferenças em sua estrutura fina de acordo com a idade do cultivo em relação à eletrondensidade da parede celular, eletrondensidade citoplasmática, homogeneidade e textura do citoplasma, presença de corpos eletrondensos e estruturas vacuolares. Algumas regiões de alta densidade são visualizadas na parede celular, na qual também observou-se camadas distintas.

A membrana citoplasmática também exhibe alguns pontos de alta eletrondensidade. Vacuolização citoplasmática e diminuição da eletrondensidade são visíveis em função do tempo de cultivo. Adicionalmente, grandes regiões transparentes foram observadas no citoplasma dessas hifas. Inclusões eletronalucidas, de diferentes tamanhos, dispersas no citoplasma e adjacentes a face interna da membrana citoplasmática são visualizadas (Figura 9).

Amostras de hifas cultivadas em meio SMM2, submetidas ao método de rotina apresentaram diferenças na ultraestrutura celular em função do tempo de cultivo, associadas, como anteriormente, à variação na eletrondensidade celular, vacuolização, homogeneidade citoplasmática e espessura da parede celular. Inúmeras inclusões membranosas foram também observadas (Figura 10).

Contudo, comparando-se essas amostras às cultivadas em SMM1, verifica-se o surgimento de diferenças em relação à ultraestrutura das amostras crescidas nas diferentes concentrações de fosfato do meio. Diferenças em relação à eletrondensidade, presença de corpos eletrondensos, presença de estruturas membranosas, granulação e homogeneidade citoplasmática são visualizadas.

Figura 9. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM1: Eletronmicrografia de Transmissão- Método de rotina. A- 3 dias de cultivo 14000X; B- 6 dias de cultivo 8000X; C- 9 dias de cultivo 14000X; D-12 dias de cultivo 14000X. Parede celular (→), Corpos eletrondensos (*).

Figura 10. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM2: Eletronmicrografia de Transmissão- Método de rotina. A- 3 dias de cultivo 20000X; B- 6 dias de cultivo 20000X; C- 9 dias de cultivo 20000X; D-12 dias de cultivo 8000X. Parede celular (→), Corpos eletrondensos (*).

Pelos resultados obtidos com a análise em microscopia eletrônica de transmissão, método de rotina, de *C.elegans* cultivada em meio sem fosfato (SMM3), nota-se novamente, diferenças estruturais relativas à fase de crescimento da hifa, eletrondensidade, vacuolização, espessura de parede e presença de corpos eletrondensos (Figura 11). Uma análise comparativa entre hifas cultivadas nos meios SMM1 e SMM2 permitiu verificar diferenças ultraestruturais entre as amostras cultivadas nos diferentes meios, o que significa uma possível resposta ao aumento da concentração do fosfato no meio de crescimento.

Comparando-se as hifas cultivadas nos diferentes meios visualizam-se diferenças em relação a eletrondensidade celular, espessura da parede, homogeneidade e textura do citoplasma, processo de vacuolização e presença de corpos com diferentes eletrondensidades.

Verifica-se que as amostras cultivadas em SMM1 exibiram menor padrão de eletrondensidade quando comparadas com as obtidas em SMM2 e SMM3. Contudo, aquelas cultivadas em SMM2 exibiram paredes celulares mais espessas, as maiores eletrondensidades, vacuolização e diferenças citoplasmáticas, e a presença de corpos eletrondensos, com diferentes tamanhos, formas e distribuição foi também maior nessas amostras.

Adicionalmente, diferenças em relação à fase de cultivo foram detectadas. Células em fase exponencial de crescimento exibem paredes mais delgadas, menor eletrondensidade, menor quantidade de vacúolos e corpos eletrondensos, citoplasma mais homogêneo em relação às células em fases estacionária de crescimento.

Figura 11. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM3: Eletronmicrografia de Transmissão- Método de rotina. A- 3 dias de cultivo 14000X; B- 6 dias de cultivo 14000X; C- 9 dias de cultivo 14000X; D-12 dias de cultivo 10000X. Parede celular (→), Corpos eletrondensos (*).

C. elegans cultivada em meio SMM1 exibiu marcação citoquímica para polifosfato sob a forma de grânulos eletrondensos dispersos no citoplasma, na face interna da membrana citoplasmática e na parede celular (Figura 12).

Contudo, a intensidade de marcação dos produtos de reação variou de acordo com o tempo de cultivo. Amostras com três dias exibiram maior marcação citoquímica sob a forma de pequenas granulações no citoplasma e na face interna da membrana celular.

Amostras correspondentes aos seis dias de cultivo exibiram intensa marcação citoplasmática sob a forma de grandes grânulos dispersos. Amostras com nove e doze dias de cultivo apresentaram diminuição da intensidade de marcação citoquímica, onde os produtos de reação apresentam-se sob a forma de pequenos grânulos dentro de estruturas membranosas no citoplasma (Figura 12).

Amostras de *C. elegans* cultivadas no meio SMM2 exibiram produtos de reação para polifosfato dispersos no citoplasma, membrana e parede celular, como àquelas cultivadas em SMM1. Entretanto, as hifas exibiram maior intensidade de marcação, e os produtos de reação apresentaram-se sob a forma de grânulos e grandes agregados de diferentes formas e tamanhos. Adicionalmente, foi observada intensa deposição de produtos de reação no citoplasma. Contudo, as amostras correspondentes àquelas com 3 e 9 dias de cultivo exibiram as maiores intensidades de marcação.

A distribuição dos produtos de reação variou, onde amostras correspondentes aos três dias de cultivo exibiram marcação citoplasmática sob a forma de pequenos depósitos eletrondensos dispersos de forma heterogênea. As amostras com 9 dias de cultivo exibiram a maior intensidade de marcação, como observado pela presença de grandes grânulos eletrondensos na superfície externa da parede celular e agregados de alta eletrondensidade em estruturas membranosas citoplasmática (Figura 13).

Amostras com seis dias apresentaram a menor intensidade de marcação com a presença de poucos produtos de reação no citoplasma e parede celular. Amostras com doze dias exibiram poucos produtos de reação no citoplasma e maior abundância na face interna da membrana citoplasmática e alguns depósitos sob a forma de precipitados com diferentes tamanhos e depósitos agregados na face externa da parede celular. Nota-se variação na forma, tamanho e localização dos produtos de reação ao longo do crescimento. O cultivo em presença de diferentes concentrações de fosfato influenciou o comportamento citoquímico do polifosfato em *C. elegans* (Figura 13).

Por outro lado, amostras de *C. elegans* cultivadas em meio SMM3, sem fosfato, exibiram raras deposições de corpos eletrondensos correspondentes a produtos de reação citoquímica no citoplasma e parede celular. Deposição dos produtos de reação foram observados nas diferentes camadas das paredes celulares, porém a intensidade de marcação variou em função do meio e da fase de crescimento das células (figuras 14).

As amostras de *C. elegans* cultivadas em meio SMM2 apresentaram a maior intensidade de marcação citoquímica para polifosfato quando comparada àquelas cultivadas em SMM1 e SMM3. Já as amostras cultivadas em meio SMM1 e SMM2 exibiram produtos de reação dentro de vacúolos sob a forma de precipitados granulares.

Figura 12. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM1: Eletronmicrografia de Transmissão- Citoquímica para polifosfato. A- 3 dias de cultivo 20000X; B- 6 dias de cultivo 27000X; C- 9 dias de cultivo 20000X; D-12 dias de cultivo 14000X Produtos de marcação citoquímica (►).

Figura 13. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM2: Eletronmicrografia de Transmissão- Citoquímica para Polifosfato. A- 3 dias de cultivo 27000X; B- 6 dias de cultivo 20000X; C- 9 dias de cultivo 50.000X; D-12 dias de cultivo 20000X. Produtos de marcação citoquímica (►).

Figura 14. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SMM3: Eletronmicrografia de Transmissão- Citoquímica para polifosfato. A- 3 dias de cultivo 20000X; B- 6 dias de cultivo 20000X; C- 9 dias de cultivo 20000X; D-12 dias de cultivo 14000X. Produtos de marcação citoquímica (►).

6. DISCUSSÃO

O fósforo é essencial para a síntese de ácidos nucleicos, além de atuar como intermediário metabólico e essencial nos processos de transferência de energia. Adicionalmente, é integrante de fosfolipídeos, nucleotídeos entre outros constituintes celulares. De modo geral, a forma de estocagem corresponde a polifosfatos, polímeros lineares, com número de grupamentos distintos. O fósforo é encontrado condensado sob a forma de compostos orgânicos e inorgânicos (Jennings, 1995).

O fósforo é geralmente utilizado sob a forma de fosfatos, mais especificamente, ortofosfatos. O conhecimento sobre os mecanismos de transporte, internalização do fósforo, estoque e utilização de fosfatos em fungos decorre de estudos realizados com leveduras (Beever e Burns, 1980). Uma vez internalizado, o fosfato poderá ser incorporado em metabólitos primários fosforilados, moléculas estruturais, ácidos nucleicos e polifosfatos, podendo ser, adicionalmente, ativamente transportado para vacúolos. O transporte para vacúolos e a formação de polifosfatos pode representar o principal mecanismo pelo qual os fungos controlam a conteúdo de ortofosfato (Jennings, 1995).

O papel do fosfato é estudado em muitos tipos celulares, sendo a sua presença ou ausência no meio de cultivo a causa de respostas diferenciadas em função de cada organismo. Para alguns, é essencial para o crescimento, para outros, sua ausência não está diretamente associada à falta de crescimento (Jennings, 1995).

O processo de crescimento celular resulta da modificação química e estrutural na organização celular, as quais funcionam como marcadores para os diferentes estágios de desenvolvimento. À semelhança das bactérias, os fungos são extremamente versáteis em suas respostas à variações nas condições ambientais. 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).

As condições físicas do ambiente, como temperatura, pH, aeração, radiação, entre outras, também induzem respostas diferentes, como forma de adaptação ao meio ambiente, e portanto dizem respeito à sobrevivência celular (Garraway e Evans, 1984; Jennings, 1995; Griffin, 1994).

A realização deste trabalho permitiu verificar que diferentes concentrações de fosfato, no meio de cultivo, influenciaram de forma significativa o crescimento das culturas de *C. elegans*.

Diferenças no rendimento da biomassa, consumo de fosfato disponível, comportamento do pH e consumo de glicose foram avaliadas, observando-se que o aumento da concentração de fosfato no meio de cultivo induziu um aumento no conteúdo de polifosfato em *C. elegans* com diferentes idades de cultivo.

O maior rendimento de biomassa 3.29 g/L foi obtido com o cultivo na concentração de 2.5g/L de fosfato no meio (SMM2), o que representa um aumento de 4% em relação ao meio SMM1 (0.5 g/L de fosfato).

O cultivo de *C. elegans* na ausência de fosfato permite verificar uma queda de 92% da biomassa em relação ao meio convencional de Hesseltine e Anderson SMM1.

Alguns estudos apontam a influência do fosfato sobre o crescimento de microrganismos. A literatura revela que em presença de maiores quantidades de fosfato disponível no meio de cultivo, microrganismos respondem com um aumento significativo do rendimento de sua biomassa e, conseqüentemente de seu conteúdo de polifosfato

(Campos-Takaki, 2000; McGrath e Quinn, 2000; Vagabov et al., 2000; Smirnov et al., 2002).

Os resultados permitiram verificar que o conteúdo de polifosfato total da biomassa variou de forma proporcional a concentração de fosfato utilizado no meio de cultivo. O maior conteúdo de polifosfato correspondeu a fase exponencial de crescimento, sugerindo papel relevante e alta atividade metabólica. O polifosfato celular diminuiu ao longo do crescimento, atingindo menor quantidade nas células com doze dias de cultivo, fase estacionária de crescimento.

Em relação ao conteúdo de fosfato total na biomassa de *C. elegans*, pode-se verificar que, ao longo do tempo, ocorre um aumento de 45%, 73%, 115% e 142%, relativas ao terceiro, sexto, nono e décimo segundo dias de crescimento, respectivamente, comparando-se o meio SMM2 (2,5 g de fosfato de potássio) ao SMM1 (0,5 g de fosfato de potássio).

Mudanças na quantidade de polifosfato celular são estudadas em fungos e os resultados apontam que, além da concentração de fosfato, o tipo de molécula utilizada como fonte influencia o comportamento celular, sendo fosfatos de potássio e magnésio aqueles de maior influência (Jennings, 1995; McGrath e Quinn, 2000; Vagabov et al., 2000; Smirnov et al., 2002).

Estudos recentes demonstraram que o metabolismo do polifosfato observado em diferentes compartimentos celulares está associado com as atividades específicas dessas estruturas. De modo geral, fisiologicamente, polifosfatos são considerados em termos de suas solubilidades em ácidos e álcalis, considerando-se o peso molecular. Dessa forma, a categorização das frações do polifosfato de uma célula torna-se importante à medida que indicam diferentes funções e depende do estágio de crescimento do organismo (Harold,

1966; Jennings, 1995; Rao et al., 1998; Rao e Kornberg, 1996; Barak e Rijn, 2000; Kuroda e Ohtake, 2000; McGrath e Quinn, 2000; Vagabov et al., 2000; Smirnov et al., 2002).

Os resultados deste trabalho demonstraram variações quantitativas e qualitativas em relação às diferentes frações do polifosfato extraído do micélio de *C. elegans* nas fases exponencial e estacionária, as quais são apoiadas pela literatura, embora sejam as primeiras informações relativas a um fungo filamentosos (Vagabov et al., 2000; Smirnov et al., 2002).

Através da microscopia eletrônica tornou-se possível a análise de proteínas/enzimas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, conseqüentemente, informações adicionais foram geradas, as quais associadas a bioquímica, a genética e a fisiologia introduziram novas perspectivas quanto ao funcionamento da célula fúngica (Klomprens, 1990).

Na área da micologia um número razoável de espécies tem sido avaliadas através da citoquímica e imunocitoquímica ultraestrutural gerando dados para uma melhor caracterização da natureza de diferentes constituintes celulares (Barkai-Golan et al., 1978; Bendayan e Stephens, 1984; Berbee e Kerwin, 1993).

Com a utilização do método de rotina neste estudo foi possível verificar diferenças na estrutura fina de *C. elegans* cultivada nos três diferentes meios de cultivo. Variações relacionadas à textura citoplasmática, organização do citoplasma e eletrondensidade celular foram detectadas. O mecanismo pelo qual o fosfato induziria diferenças na citoquímica ultraestrutural, poderia representar formas de utilização do nutriente, as quais influenciariam a síntese de biomoléculas pelo organismo

Estudos relacionados à formação, distribuição e utilização de polifosfatos são muito comuns em bactérias. Nesses organismos, citoquimicamente o polifosfato está representado

pelos grânulos de volutina ou metacromáticos (Kjeldstad et al., 1991; Bode et al., 1993; Kornberg, 1995).

A presença de polifosfatos foi relatada para Zygomycetes por Dietrich (1976), com o emprego de ensaio bioquímico em extratos miceliais investigados através de eletroforese em gel de agarose.

Campos Takaki (1983), revelou a presença de polifosfato nas paredes de espécies de Zygomycetes com o emprego da análise por Raios X.

Shari'a et al. (2002) analisaram, citoquimicamente, a distribuição de polifosfato em hifas de Zygomycetes - *Gongronella butleri*, *Absidia cylindrospora* e *Mucor javanicus*, verificando variações no padrão de marcação quanto a distribuição, localização e arranjos dos produtos de reação em função da fase de crescimento das espécies estudadas. Da mesma forma, a marcação citoquímica em *C.elegans* variou em intensidade, distribuição e localização de acordo com o tempo de cultivo. Além do mais, no presente estudo, verificou-se mudança de intensidade de marcação citoquímica de acordo com a concentração de fosfato no meio de cultivo.

A partir dos resultados desse estudo, verificou-se que *C. elegans* armazena o polifosfato sob a forma de corpos eletrondensos com diferentes arranjos. Produtos de reação sob a forma de grânulos, fibrilas e agregados eletrondensos distribuídos de forma homogênea na superfície celular, dispersos no citoplasma, na membrana de estruturas citoplasmáticas e na face citoplasmática da membrana celular foram visualizados, sendo as primeiras informações na literatura.

7. CONCLUSÕES

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

1. A concentração de fosfato no meio de cultivo tem influência sobre o crescimento e a produção de biomassa, assim como sobre o potencial de acumulação de fosfato;
2. O processo de extração seqüencial do polifosfato no micélio permite demonstrar maior conteúdo da fração solúvel em base;
3. A análise ultraestrutural pelo método de rotina permite verificar variações na estrutura fina das hifas, com relação à eletrondensidade e homogeneidade celular, presença de corpos eletrondensos e estrutura da parede celular, em diferentes estágios de crescimento e nos distintos meios utilizados;
4. A citoquímica ultraestrutural demonstra variação no comportamento do polifosfato nas hifas, em função dos meios com diferentes conteúdos de fosfato e do tempo de crescimento, e em relação à localização, distribuição e arranjo dos produtos de reação;
6. *Cunninghamella elegans* é capaz de acumular polifosfato como resposta à concentração de fosfato disponível no meio de cultivo.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, Jonh Wiley & Sons publishers, 1996.
- AOKI J; NIREUBERJ H. I. - *Fusarium globosum* from Subtropical Japan and the Effect of Different Light Conditions on its Conideogenesis. **Mycoscience**, v. **40**, p.1-9, 1999.
- BAIJAL, U., MEHROTRA, B. S. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. **Sydowia**, v. **33**, 1-13. 1980.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 22, p. 87 -108, 1968.
- BARKAI-GOLAN, R.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *aspergilli*. **Archives of Microbiology**, v.**116**, p.119-124, 1978.
- BARAK, Y; RIJN, J.V. Relationship between Nitrite Reduction and Active Phosphate Uptake in the Phosphate-Accumulation Denitrifier *Pseudomonas sp.* Strain JR 12. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. **66**, N° 12, p.5236-5240, December 2000.
- BEEVER, R.E., BURNS, D.J.W. Adaptative changes in phosphate uptake by the fungus *Neurospora crassa* in response to phosphate supply. **Journal of Bacteriology**, v. **134**, p. 520-525, 1977.
- BENDAYAN, M.; STEPHENS, H. Double labeling cytochemistry applying the protein A-gold technique. **Immunolabelling for Electron Microscopy**. Polak/Varndell. Eds, Elsevier Science Publisher, 1984.
- BERBEE, M.L.; KERWIN, M. Ultrastructural and light microscopic localization of carbohydrates and peroxidase/catalase in *Langenidium giganteum* zoospores. **Mycology**, v.734-743 ,1993.

- BODE, G.; MAUCH, F.; DITSCHUNEIT, H.; MALFERTHEINER, P. Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 3029-3033, 1993.
- BOLESCH, D.G; KEASLING, J.D. Polyphosphate Binding and Chain Length Recognition of *Escherichia coli* Exopolyphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275 (43), p. 33814- 33819, 2000.
- BRACKER, C.E. The Ultrastructure and Development of Sporangia in *Gilberteria persicaria*. **Mycologia**, v. 60, p.1016-1067, 1968.
- CAMPOS TAKAKI, G.M.; BEAKES, G.W.; DIETRICH, S.M. Electron microscopy X-ray microprobe and cytochemical study of isolated cell walls of mucoralean fungi. **Transaction of British Mycological Society**, v. 80, 1983.
- CAMPOS TAKAKI, G.M. Presence of inorganic polyphosphate in Mucoralean fungi. Annual Publisher of Resarch Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japão.2000.
- CARLILE, M.J; WATKINSON, S.C. **The Fungi**. Tokyo, Academic press., 1996.
- COLLINS, S.; POPE, R.K.; SCHEETZ, R. W.; RAY, R. I.; WAGNER, P.^a & LITTLE, B.J. Advantages of envirometal scanning electron microscopy in studie of microorganisms. **Microscopy Research Technology**, v. 25, p.398-408, 1993.
- DE SOUZA, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas.Rio de Janeiro-Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.
- DIETRICH, S.M.C. Presence of polyphosphate of low molecular weight in Zygomycetes. **Journal of Bacteriology**, v.127, p.1408-14-13. 1976.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. Vol. 1. Academic Press. 120p. 1980.

- EBBEL, J.P; COLAS, J; MULLER, S. II. Misu au Point de Méthodes de Détection Cytochimiques des Polyphosphates. **Experimental Cell Research**, v.15, p.28-36, 1958.
- EDELMANN, R.E.; KLOMPARENS, K.L. Zygosporogenesis in *Zygorhynchus heterogamus*, with a proposal for standardization of structural nomenclature. **Mycologia**, v. 87, p.304 - 318, 1995a.
- EDELMANN, R.E.; KLOMPARENS, K.L. Low temperature scanning electron microscopy of the ultrastructural development of zygosporangia and sporangiosporangia in *Mycotrichia africana*, and the effects of cultural conditions on sexual versus asexual reproduction. **Mycologia**, v. 90, p.212-218, 1995b.
- 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.
- GARRAWAY, M.O; EVANS, R.C.. **Fungal nutrition and physiology**. John Willey & Sons Incorporation publishers. 401p. 1984.
- GREENFIELD, N. J.; HUSSAIN, M. & LENARD, J. Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a P-nuclear magnetic resonance study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 926, p. 205-214, 1987.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York, John Wiley e Sons publishers, p.458. 1994.
- HAROLD, F.M. Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function. **Bacteriological Reviews**, Dec., p.772-794, 1966.
- HAYATT, M. A - **Principles and techniques of electron microscopy. Biological application**. 3rd. Edition. Macmillan Press Scientific & Medical Ltd. 469 p. 1989.

- HAWKER, L.E.; ABBOTT, P.McV. An electron microscope 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, Harper & Row, 1974.
- HERRERA, T.; ULLOA, M. **El Reino de los Hongos (micología básica y Aplicada)**. 2^a ed, 1998.
- HESSELTINE, C.W; ANDERSON, R.F. Microbiological Production of Carotenóides I. Zygosporé and Carotene produced by Intraspecific and crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. **Mycology**, v. **49**, P.449-452, 1957.
- HOLLENBERG, M.J. ERICKSON, A..M. The scanning electron microscope: potencial usefulness to biologists. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. **21**, p.109-130, 1973.
- JENNINGS, D.H. **The Physiology of fungal nutrition**. Cambridge University press 1995.
- JOHNSON, M.; CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In: **The molecular and cellular biology of the *Saccharomyces* gene expression**, Ed. E.W. Jones, J. R. Pringle, and J. R. Broach, Cold Spring Harbor, New York. 1992.
- 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.
- KANA-UCHI, A, FUKATSU, T. Light Induced Fruit Body Formation of na Entomogenous Fungus *Paecilomyces termipes*. **Mycoscience**, v. **40**, p.349-351, 1999.

- KEASLING, L.D; VAN DIEN, S.J; TRELSTAD, P; RENNINGER, N; MCMAHON, K.
Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems.
Biochemistry (Moscow), Mar; v. 65 (63), p.324-331, 2000.
- KIHARA, J., WATANABE, Y., HONDA, Y. - Suppression and Reactivation of UV-Induced Sporulation by Blue Light in *Bipolaris oryzae*. **Mycoscience**, v. 40, p.363-366, 1999.
- KITAMOTO, Y., AKITA, K., HORIKOSHI, T. - Effects of High-Temperature Treatment on Two Essential Light Processes and an Intervening Dark Process in Photoinduced Pileus Primordium Formation of a Basidiomycete, *Favolus arcularius*. **Mycoscience**, v. 40, p.103-108, 1999.
- KJELDSTAD, B.; HELDAL, M.; NISSEN, H.; BERGAN, A.S.; EUJEN, K. Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium acnes* after near-UV irradiation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p.562-567, 1991.
- KLOMPARENS, K. L. - The development and application of ultrastructural research in mycology. **Mycopathologia**, v. 109, p.139-148, 1990.
- KORNBERG, A; RAO, N.N; AULT-RICHE, D. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68; p.89-125, 1999.
- KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p.491-496, 1995.
- KULAEV, I.S; VAGABOV, V.M; KULAKOVSKAYA, T.V; LICHKO, L.P; ANDREEVA, N.A; TRILISENKO, L.V. The development of A.N. Belozersky's Ideas in Polyphosphate Biochemistry. **Biochemistry (Moscow), v. 65 (3)**, p.271-278, 2000.
- KULAEV, I.S. Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. **Biochemistry (Moscow), v. 65 (3)**, p.269-270, 2000.

- KURODA, A; OHTAKE,H. Molecular Analysis of Polyphosphate Accumulation in Bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. **65 (3)**, p.304-308, 2000.
- KULAEV, I; KULAKOVSKAYA, T. Polyphosphate and Phosphate Pump. **Annual Review of Microbiology**, v. **54**, p.709-734, 2000.
- KUMBLE, K.D; KORNBERG, A. Endopolyphosphatases for Long Chain Inorganic Polyphosphate in Yeast and Mammals. **Journal of Biological Chemistry**, v. **271 (43)**, p. 27146-27151, 1996.
- KUMBLE, K.D; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate in Mammalian Cell and Tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. **270 (11)**, p.5818-5822, 1995.
- KURODA, A; KORNBERG, A. Polyphosphate Kinase as a Nucleoside Diphosphate Kinase in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. **94 (2)**, p.439-442, 1997.
- LAMACKA, M.; SAJBIDOR, J. The content of prostaglandins and their precursors in *Mortierella* and *Cunninghamella* species. **Letters of Applied Microbiology**, v. **26**, p.224-226. 1998.
- LEHRER, R.I; HOWARD, D.H; SYPHER, P.S; EDWARD, E.S.J.E; SEGAL, G.P; WINSTON, D.J. Mucormycosis. **Annals of Internal Medicine**, v. **93**, 1980.
- LEVY, S. A; SCHMIFF, K.W.; KAUFMAN, L. Systemic zygomycosis diagnosed by fine needle aspiration and confirmed with enzyme immunoassay. **Chest**, v. **90**, p.146-148, 1986.
- MAIA, L.C.; KIMBROUGH, J.W. & BENNYG. Ultrastructural studies of the spore wall of *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycologia**, v. **85**, p.883-889, 1993.
- MCKEOWN, T. A., MOSS, S. T., JONES B. G. - Ultrastructure of ascospores of *Tunicaspora australiensis*. **Mycological Research**, v. **100**, p.1247-1255, 1996.

- MCGRATH, J.W; QUINN, J.P. Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the *Candida humicola* G-1 in Response to Acid pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **66** (**9**), p.4068-4073, September, 2000.
- MINO, T; VANLOOSDRECHT, M.C.M; ; HEIJNEN, J.J. Microbiology and Biochemistry of The enhanced Biological Phosphate Removal Process. **Water Research**, v. **32**, p.3193-3207, 1998.
- MIMS, C. W. - Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, v. **83**, p. 1-19, 1991.
- O'DONNELL, K. L. **Zygomycetes in culture**. University of Georgia. 257p. 1979.
- ORLOWSKI, I. M. *Mucor* dimorphism. **Microbiological Reviews**, v. **55**, p. 234-258. 1991.
- OSHIMA, Y. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes and Genetics Systems**, v. **72**, p.323-334, 1997.
- POOLMAN, B.; NIJSSEN, R.M.J.; KONNINGS, W.N. Dependence os *Streptococcus lactis* phosphate transport on internal phosphate concentration and internal pH. **Journal of Bacteriology**, v. **169**, p.5373-5378, 1987.
- POTHULURI, J.V., FREEMAN, J. P., EVANS, F.E., CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. **58**,p.3654-3659, 1992.
- POTHULURI, J.V., DOERGE, D. R., CHURCHWELL, M. I., FU, P. P., CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. **53**, 153-174, 1998a.
- POTHULURI, J.V., SUTHERLAND, J. B., FREEMAN, J. P., CERNIGLIA, C. E. Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. **Applied Environmental Microbiology**, v.**64**, p.3106-3109, 1998b.

- RASHID, M.H; RUMBAUGH, K; PASSADOR, L; DAVIS, D.G; HAMOOD, A.N; IGLEWSKI, B.H; KORNBERG, A. Polyphosphate Kinase is Essential for Biofilm Development, Quorum sensing, and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy Science, USA, v. 97 (17)**, p.9636-9641, August15, 2000.
- RASHID, M.H; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate is Needed for Swimming, Swarming, and Twitching Motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy Science, USA, 97(9)**, p.4885-4890, 2000a.
- RASHID, M.H; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate is Required for Motility of Bacterial Pathogens. **Journal of Bacteriology, v. 182 (1)**, p.225-227, 2000b.
- RAO, N.N; LIU, S; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate in Escherichia coli: The Phosphate Regulon and the Stringent Response. **Journal of Bacteriology, v. 180 (8)**, p. 2186-2193, 1998.
- RAO, N.N; KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate Supports Resistance and Survival of Stationary-Phase Escherichia coli. **Journal of Bacteriology, v. 178 (5)**, p.1394-1400, 1996.
- 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.
- RIVERO, F.& CERDÁ-OLMEDO, E. - Spore Germination in *Phycomyces blakesleeanus*. **Mycologia, v. 86**, p.781-786, 1994.
- SAIKAWA, M. & KATSURASHIMA, E. Light and electron microscopy of a new species of *Euryancale* producing phallus-shaped conidia. **Mycologia, 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.
- SHARI'A, A.E.N.; NASCIMENTO, A.E.; LIMA, M.A.B.; TAKAKI, G.M.C.; DE SOUZA, W. Polyphosphate in Zygomycetes: A cytochemical study. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.**33**, p.119-126, 2002.
- SHIBA, T; TSUTSUMI, K; ISHIGE, K; NOGUCHI, T. Inorganic Polyphosphate and Polyphosphate Kinase: Their novel Biological Functions and Applications. **Biochemistry (Moscow)**, v. **65 (63)**, p.315-323, 2000.
- SHIPTON, W. A , LUNN, J. A . Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. **Transactions of British Mycological Society**, v. **74**, p.483-491, 1980.
- SMITH, J. E., DEANS, S. G., ANDERSON, J. G., DAVIS, B. - The Nature of Fungal Sporulation. In: **Biotechnology and Fungal Differentiation. FEMS SYMPOSIUM**, v. **40**, p.17-41, 1977.
- SMIRNOV, A.V.; KULAKOVSKAYA, I.S.; KULAEV, I.S. Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. **Process Biochemistry**, v.**37**, p.643-649, 2002.
- TAKEO, K.; MINE, H.; SANO, A ; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. - Comparison of Yeast Plasma Membrana Ultrastructure 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.
- THAM, L., X., MATSUHASHI, S., KUME, T. - Growth and Fruit Body Formation of *Gracioderma lucidum* on Media Supplemented with Vanadium, Selenium and Germanium. **Mycoscience**, v. **40**, p.87-92, 1999.

- TRUFEM, S. F. B.. Mucorales do estado de São Paulo. 3. Gêneros *Circinella* van Tieghem & Le Monier e *Cunninghamella* Matruchot. **Rickia**, v. **9**, p.113-120, 1981.
- TZENG, C.M; KORNBERG, A. The Multiple Activities of Polyphosphate Kinase of *Escherichia coli* and their Subunit Structure Determined by Radiation Target Analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. **275 (6)**, p.3977-3983, 2000.
- URECH, K.; DURR, M.; BOLLER, I.H.; WIEKEN, A; SCHWENCKE, J. Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. **116**, p.275-278, 1978.
- VAN LOOSDRECHT, M.C; SMOLDERS G.J; KUBA, T; HEIJNEN, J.J. Metabolism of Microorganisms Responsible for Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. **71 (1-2)**, p.109-116, 1997.
- VAGABOV, V.M; TRILISENKO, L.V; KULAEV, I.S. Dependence of Inorganic Polyphosphate Chain Length on the Orthophosphate Content in the Culture Medium of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry (Moscow)**, v. **65 (3)**, p.349-354, 2000.
- WEITZMAN, I., WHITTIER, S., McKITRICK, J. C., DELLA-LATTA, P. - Zygosporangium: the last word in identification of rare and atypical zygomycetes isolated from animal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. **33**, p.781-783, 1995.
- WOOD, H.G; CLARCK, J.E. Biological Aspects of Inorganic Polyphosphate. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. **57**, p.253-260, 1988.
- 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, EB. 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, 1996a.

ZHANG, D., FREEMAN, J. P., SUTHERLAND, J. B., WALKER, A E., YANG, Y., CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. **62**, p.798-803, 1996b.

9. ADENDO

As pesquisas desenvolvidas durante o período de vigência do Mestrado foram divulgadas nos seguintes eventos:

Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B., Campos-Takaki, G.M.C.; Souza, W. Lectins Cytochemistry in Zygomycetes. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu-PR, 21 a 25 de Outubro de 2001.**

Villarim, T.; Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B. Actin Cytoskeleton Structure and Localization and Organelles Interaction in *Rhizopus arrhizus*. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu-PR, 21 a 25 de Outubro de 2001.**

Marinho, P.H.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B. Phosphate Effects on Ultrastructural Cytochemistry of *Cunninghamella bertholletiae* isolates. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu-PR, 21 a 25 de Outubro de 2001.**

Moura, D.; Lima, M.A.B.; Takaki, G.M.C.; Nascimento, A.E. Citoquímica Ultraestrutural de Bactérias Isoladas de Lodo da Indústria Têxtil. **8º Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Rio de Janeiro, 24 a 28 de Novembro de 2002.**

Bastos, J.P.A.; Lima, M.A.B.; Nascimento, A.E.; Takaki, G.M.C. Aspectos Bioquímicos e Atividades Enzimáticas de Amostras de *Cunninghamella elegans* Isoladas de Mangue. **8º Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Rio de Janeiro, 24 a 28 de Novembro de 2002.**

Cavalcanti, E.M.; Moura, D.; Nascimento, A.E.; Barreira, V.K.; Lima, M.A.B. Comportamento Citoquímico e Aspectos Bioquímicos de Espécies de *Mucor*. **8º Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Rio de Janeiro, 24 a 28 de Novembro de 2002.**

Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B.; Takaki, G.M.C.; Souza, W. Polyphosphate in Zygomycetes: A Cytochemical Study. **Brazilian Journal of Microbiology, 33: 119-126, 2002.**