

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**



**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO EFEITO DO CÁDMIO EM
Cunninghamella elegans: MECANISMOS DE TOLERÂNCIA,
CAPACIDADE DE SORÇÃO E ACUMULAÇÃO DE
POLIFOSFATO**

MARCOS ANTONIO BARBOSA DE LIMA

**Recife-PE
2007**

MARCOS ANTONIO BARBOSA DE LIMA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO EFEITO DO CÁDMIO EM
Cunninghamella elegans: MECANISMOS DE TOLERÂNCIA,
CAPACIDADE DE SORÇÃO E ACUMULAÇÃO DE
POLIFOSFATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de Biologia de Fungos.

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

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aline Elesbão do Nascimento

**Recife-PE
2007**

Lima, Marcos Antônio Barbosa de.

Aspectos fisiológicos do efeito do cádmio em *Cunninghamella elegans* : mecanismos de tolerância, capacidade de sorção e acumulação de polifosfato / Marcos Antônio Barbosa de Lima – Recife: O Autor, 2007.

110 folhas : il., fig., tab.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Biologia de fungos, 2007.**

Inclui bibliografia.

1. Fungos 2. *Cunninghamella elegans* 3. Metal pesado (cádmio) 4. Biorremediação I. Título.

**582.28
579.5**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-009**

COMISSÃO EXAMINADORA

Galba Maria de Campos Takaki

Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Centro de Ciências e Tecnologia (UNICAP), Recife-PE

Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti

Prof^ª. Dr^ª. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Departamento de Micologia (UFPE), Recife-PE

Kaoru Okada

Prof^ª. Dr^ª. Kaoru Okada
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UNICAP), Recife-PE

Maria do Socorro Vieira Pereira

Prof^ª. Dr^ª. Maria do Socorro Vieira Pereira
Departamento de Biologia Molecular (UFPB), João Pessoa-PB

Carlos Alberto Alves da Silva

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Centro de Ciências e Tecnologia (UNICAP), Recife-PE

***“O pensamento é grande, rápido
e livre; é a luz do mundo e a
glória maior do ser humano.”***

Bertrand Russell

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter permitido alcançar este objetivo.

A meus pais João Barbosa da Cruz e Sueli Barbosa de Lima pela minha educação e pelo incentivo e apoio fundamental durante minha formação acadêmica.

À Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki pela orientação no decorrer desses exatos 10 anos de trabalho e por ter sido decisiva na minha formação acadêmica.

À Prof^ª. Dr^ª. Aline Elesbão do Nascimento pela amizade, presteza e constantes ensinamentos durante esses 10 anos de convívio e trabalho;

À Luciana Franco pelo companheirismo, amizade, apoio, incentivo e carinho.

À Bruno Távora, pela importante ajuda concedida na análise das amostras por espectrofotometria de absorção atômica.

A Patrícia Mendes e Petrusk Homero pela constante ajuda no transcórrer desse trabalho;

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

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

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

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

A CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
2.1. POLUIÇÃO AMBIENTAL POR METAIS PESADOS	08
2.1.1. Considerações Gerais.....	08
2.1.2. Toxicidade do Cádmio	10
2.1.3. Interação dos Microrganismos com Metais Pesados.....	13
2.2. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS DE REMOÇÃO DE METAIS	15
2.2.1. Biorremediação.....	17
2.2.2. <i>Cunninghamella elegans</i>	18
2.3. POLIFOSFATO INORGÂNICO	19
2.3.1. Considerações Gerais	19
2.3.2. Papel do Polifosfato na Tolerância a Metais Pesados	22
2.4. ULTRA-ESTRUTURA E CITOESQUELETO DE ACTINA	23
3. REFERÊNCIAS	25

PRIMEIRO ARTIGO

TÍTULO - Toxicidade do Cádmio para <i>Cunninghamella elegans</i>: alterações ultra-estruturais e do citoesqueleto de actina.....	38
RESUMO.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
Microorganismos e Condições de Cultivo.....	43
Histoquímica para Citoesqueleto de Actina.....	43
Técnica de rotina.....	44
Citoquímica para Detecção de Carboidratos de Superfície.....	44
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	58
AGRADECIMENTOS.....	65
REFERÊNCIAS.....	65

SEGUNDO ARTIGO

TÍTULO – Acumulação e Degradação de Polifosfato por <i>Cunninghamella elegans</i> em Resposta ao Cádmio.....	71
RESUMO.....	73
INTRODUÇÃO.....	74
MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
Métodos Microbiológicos.....	76
Microorganismo e Condições de Cultivo.....	76
Curvas de Crescimento.....	76
Métodos Analíticos.....	76
Determinação de fósforo.....	76
Extração das Frações do Polifosfato.....	77
RESULTADOS.....	78
DISCUSSÃO.....	82
AGRADECIMENTOS.....	86
REFERÊNCIAS.....	87

TERCEIRO ARTIGO

TÍTULO - Remoção e Acumulação de Cádmio por <i>Cunninghamella elegans</i> em Crescimento Contínuo.....	91
RESUMO.....	93
INTRODUÇÃO	94
MÉTODOS.....	96
Microorganismo e Condições de Cultivo	96
Cinética de Remoção de Cádmio.....	96
Acumulação de cádmio	97
RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
Remoção de Cádmio.....	98
Eficiência de Remoção de Cádmio.....	100
Acumulação Celular de Cádmio.....	102
CONCLUSÕES.....	104
AGRADECIMENTOS	104
REFERÊNCIAS	104
CONCLUSÕES GERAIS	109

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Mecanismos de interação entre metais e microrganismos.....14

Fonte: Birch e Bachofen, 1990.

Figura 2. Estrutura química do polifosfato inorgânico.....20

Fonte: Reusch, 2000.

PRIMEIRO ARTIGO

Figura 1. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* controle, tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos, filamentos e placas em diferentes áreas das hifas (↔). Barra 10µm.....46

Figura 2. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* submetidas ao cultivo em presença de 5,62mg/L de cádmio, e tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos e placas em diferentes áreas das hifas (↔). Barra 10µm.....47

Figura 3. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* submetidas ao cultivo em presença de 11,24mg/L de cádmio, e tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos e filamentos em diferentes áreas das hifas (↔). Barra 10µm.....48

Figura 4. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* submetidas ao cultivo em presença de 22,10mg/L de cádmio, e tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos, filamentos, placas e “caps” em diferentes áreas das hifas (↔). Barra 10µm.....49

- Figura 5.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans* controle, técnica de rotina. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★).....50
- Figura 6.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans* cultivada em 5,62mg/L de cádmio, técnica de rotina. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Grânulos (➡).....51
- Figura 7.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultivada em 11,24 mg/L de cádmio, técnica de rotina. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Grânulos (➡).....52
- Figura 8.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultivada em 22,10 mg/L de cádmio, técnica de rotina. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Grânulos (➡); Corpos Eletrondensos (◆).....53
- Figura 9.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura controle, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Produtos de Reação (⬆).....54
- Figura 10.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura tratada com 5,62 mg/L de cádmio, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Produtos de Reação (⬆).....55
- Figura 11.** Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura tratada com 11,24mg/L de cádmio, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Produtos de Reação (⬆).....56

Figura 12. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura tratada com 22,10mg/L de cádmio, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (▶); Membrana Citoplasmática (►); Vacúolos (*); Produtos de Reação (↑).....57

SEGUNDO ARTIGO

Figura 1. Crescimento de *C. elegans* na presença de cádmio. Amostras controle (-◆-) e tratadas com cádmio nas concentrações 5,62mg/L (-■-), 11,24mg/L (-▲-) e 22,10mg/L (-*-).....78

Figura 2. Consumo de fósforo inorgânico por *C. elegans* na presença de cádmio. Amostras controle (-◆-) e tratadas com cádmio nas concentrações 5,62mg/L (-■-), 11,24mg/L (-▲-) e 22,10mg/L (-*-).....79

Figura 3. Frações do polifosfato durante crescimento de *C. elegans* em diferentes concentrações de cádmio. Amostras controle (A) e tratadas com cádmio nas concentrações 5,62mg/L (B), 11,24mg/L (C) e 22,10mg/L (D). Fração ácido-solúvel (1), Fração base-solúvel (2), Fração ácido-insolúvel (3), PoliPi total (4).....80

TERCEIRO ARTIGO

Figura 1. Percentual de remoção de cádmio do meio de cultura por *Cunninghamella elegans*.98

Figura 2. Eficiência de remoção de cádmio por *Cunninghamella elegans*.....101

Figura 3. Acumulação de cádmio por *Cunninghamella elegans*. 3 dias (coluna cinza clara) e 6 dias (Coluna cinza escura) de contato com 5.62 mg/L, 11.24 mg/L e 22.10mg/L de cádmio.....102

RESUMO

A contaminação ambiental por metais pesados é uma questão séria e mundial. O aumento das atividades industriais e a deterioração de alguns ecossistemas, devido acumulação de metais têm intensificado a poluição ambiental. O cádmio, metal pesado muito utilizado em processos industriais, é um dos elementos químicos mais tóxicos, o que o torna um relevante contaminante ambiental. Os fungos são organismos de grande importância prática por causa de sua ampla aplicação em diversas áreas da biotecnologia, sobretudo na área ambiental. Neste trabalho, os aspectos fisiológicos do efeito do cádmio concernente à resistência/tolerância a metais, metabolismo do polifosfato, alterações histoquímicas e ultra-estruturais, foram avaliados em *Cunninghamella elegans*. Os resultados obtidos demonstraram que o cádmio induziu variações na forma, arranjo e distribuição do citoesqueleto de actina, bem como na estrutura fina do fungo associado a mudanças de eletrondensidade, vacuolização, alteração na textura do citoplasma e presença de inclusões e granulações eletrondensas. A citoquímica com vermelho de rutênio revelou, por sua vez, alteração de permeabilidade celular e composição de carboidratos de superfície. Além do que foi observado que *C. elegans* é capaz resistir, crescer, remover e acumular cádmio em diferentes concentrações e que possivelmente usa o polifosfato como mecanismo de detoxificação, haja vista que seu conteúdo variou muito em função da concentração do metal. Os dados obtidos neste trabalho revelam que *C. elegans* exibe potencial de uso em biorremediação de metais.

Palavras-Chave: *Cunninghamella elegans*, Cádmio, Ultraestrutura, Polifosfato, Sorção

ABSTRACT

Environmental contamination by heavy metal is a serious and worldwide problem. The progress in industrial activities and the ecosystems deterioration due to metals accumulation have been intensified the pollution. Cadmium, a heavy metal very used in industrial processes, is one of the most toxic, which contributes being a relevant environmental contaminant. Fungi are organisms of great practical importance due to its large application in several biotechnological areas, especially in the environmental areas. In this work, the physiological aspects of cadmium effects related to metal tolerance/resistance, polyphosphate metabolism, histochemical and ultrastructural changes were evaluated in *Cunninghamella elegans*. The results obtained revealed that cadmium induced alterations in form, arrange and distribution of actin cytoskeleton, and changes in the fine structure such as eletrondensity, vacuolization and cytoplasmatic texture and granulation. The cytochemical aspects by using ruthenium red showed cellular permeability and surface carbohydrate composition alteration. It was observed that *C. elegans* is able to resist, grow, remove and accumulates cadmium at different concentrations and possibly uses the polyphosphate as a detoxification mechanism considering that its content values changes according to metal concentrations. The data obtained in this study demonstrates that *C. elegans* exhibit potential for metal bioremediation.

Keywords: *Cunninghamella elegans*, Cadmium, Ultrastructure, Polyphosphate, Sorption

1. INTRODUÇÃO

O aumento crescente do processo de industrialização tem elevado o descarte de metais pesados no meio ambiente, resultando assim na degradação de alguns ecossistemas, colocando assim em risco a saúde humana e animal (Fellenberg, 1990; Prasad, 1995).

Os microrganismos apresentam uma grande capacidade de captar e acumular metais pesados através de diversos processos, que podem ser ou não dependentes do metabolismo. Estes processos microbianos são economicamente viáveis quando comparados aos processos físico-químicos convencionais utilizados no tratamento de efluentes contaminados com metais pesados (Gomes et al., 1998).

Entre os microrganismos presentes no ecossistema, os fungos apresentam grandes vantagens, principalmente, a de tolerar a presença de metais pesados tóxicos em altas concentrações, pois possuem paredes celulares espessas, as quais apresentam em sua constituição biopolímeros como polissacarídeos e polifosfatos que exibem excelentes propriedades de ligação a metais pesados (Gupta et al., 2000).

A tolerância aos metais pesados em um grande número de microrganismos tem sido correlacionada com a presença de um homopolímero de cadeia longa de fosfatos inorgânicos, denominado de polifosfato inorgânico (PoliPi) (Keasling, 1997).

Cunninghamella elegans tem sido descrita na literatura pela capacidade de acumular fósforo na forma de polifosfato (Lima, et al., 2003). Além do que, esta espécie tem grande habilidade de metabolizar várias substâncias xenobióticas recalcitrantes, tais como: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs (Shiosaki et al., 2001), azocorantes utilizados na indústria têxtil (Ambrósio e Campos-Takaki, 2004), produtos tóxicos advindos da combustão de óleo diesel (Shiosaki et al., 2001; Cerniglia e Gibson,

1977). Paralelamente, Souza et al., 2005, mostraram que *C. elegans* foi capaz de crescer na presença do metal cobre.

Devido ao grande potencial apresentado por *Cunninghamella elegans*, e os poucos relatos a respeito de sua capacidade de tolerância a metais pesados, esta pesquisa foi realizada visando ampliar o conhecimento acerca do processo de acumulação de polifosfato inorgânico associado à habilidade de remoção de cádmio, bem como dos efeitos deste metal sobre a estrutura celular da espécie *C. elegans*, através dos seguintes objetivos:

- Investigar o efeito do cádmio sobre a estrutura fina, permeabilidade celular e carboidratos de superfície de *C. elegans*;
- Investigar o efeito do cádmio sobre o citoesqueleto de actina de *C. elegans*;
- Avaliar o comportamento do polifosfato de *C. elegans* durante crescimento em meio contendo cádmio;
- Analisar a eficiência de sorção e acumulação de cádmio de meio de cultura por *C. elegans*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLUIÇÃO AMBIENTAL POR METAIS PESADOS

2.1.1. Considerações Gerais

O grande aumento populacional associado ao incremento nas atividades industriais, tem resultado em uma descarga cada vez maior de substâncias xenobióticas e recalcitrantes no meio ambiente. Este fato, por sua vez, tem intensificado a poluição ambiental em uma escala cada vez maior, que vem alterando a composição química das águas, do solo, da atmosfera e dos sistemas biológicos, colocando em perigo não somente o bem-estar, como também a sobrevivência de diversos seres vivos (Freitas et al., 2001; Fellenberg, 1990).

Define-se como poluição qualquer alteração física, química ou biológica que produza qualquer modificação no ciclo biológico normal, interferindo na composição da fauna e da flora do meio ambiente (Aguiar e Novaes, 2002).

A água é um dos recursos naturais mais afetados pelo aumento da poluição, que vem comumente recebendo diversos resíduos contaminados com altas concentrações de substâncias poluentes como: compostos fenólicos, defensivos agrícolas, produtos petroquímicos e metais pesados. Isto vem provocando mudanças nas características físicas, químicas e biológicas das águas, interferindo assim na sua qualidade e impossibilitando o seu uso para o consumo humano (Gomes et al., 1998; Aguiar e Novaes, 2002).

A indústria química é responsável pela maioria dos descartes contendo inúmeras substâncias poluentes encontradas na natureza. Dentre os principais poluentes, destacam-se os metais e seus derivados, pois são diretamente prejudiciais à saúde

humana e aos ecossistemas, comprometendo sensivelmente à manutenção dos processos vitais (Freitas et al., 2001).

Os metais pesados constituem um grupo heterogêneo de elementos químicos, incluindo, metais, semi-metais e não metais, que possuem número atômico maior que 20 ou peso específico superior a 5 g.cm^3 , sendo considerados elementos traços por serem encontrados na natureza em partes por milhão (ppm) (Malavolta, 1994).

Estes elementos existem naturalmente no ambiente e são necessários em concentrações mínimas para manutenção dos processos vitais dos seres vivos (sendo denominados de oligoelementos ou micronutrientes). Diversos metais, tais como o ferro, cobre, zinco, cobalto, manganês, cromo, molibdênio, vanádio, selênio, níquel e estanho, participam do metabolismo e da formação de muitas proteínas, enzimas, vitaminas e pigmentos respiratórios essenciais aos diversos organismos (Griffin, 1994).

No entanto, quando ocorre o aumento de suas concentrações, normalmente acima de 10 vezes, efeitos deletérios começam a surgir, provocando diversos desequilíbrios. Os metais pesados estão entre os vários poluentes existentes, que têm recebido atenção especial, uma vez que alguns são extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos, mesmo em quantidades muito baixas, da ordem de mili ou até mesmo microgramas (Griffin, 1994; Hughes e Poole, 1989).

Além do mais, os metais pesados são contaminantes ambientais persistentes uma vez que não podem ser degradados ou destruídos. Dessa forma, tendem a acumular-se na cadeia alimentar, gerando sérios problemas ecológicos e de saúde (Malik, 2004).

Diversos setores industriais são responsáveis pela contaminação ambiental por metais, entre as quais podemos destacar: as indústrias de papel, petroquímica, de cloro, fertilizantes, refinarias de petróleo, usinas siderúrgicas, indústrias de metais não-

ferrosos, vidro, cimento, cerâmica, indústria têxtil, indústria de couros e usinas termoelétricas, entre outras (Fellenberg, 1990).

De acordo com a organização mundial de saúde, os metais que causam maior preocupação são: alumínio, cromo, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, cádmio, mercúrio e o chumbo. Diferentemente de outros contaminantes ambientais, os metais, como constituintes naturais da crosta terrestre, não devem ser eliminados, devido a sua importância para o metabolismo dos seres vivos, já que atuam como cofatores para a ativação de vários zimogênios participantes do metabolismo de organismos vivos (Ikeda et al., 2000).

Dentre os metais contaminantes, o cádmio e o mercúrio, são considerados os mais perigosos, pois além de não haver participação destes íons em nenhuma via metabólica, já é bem estabelecida a participação destes metais em episódios de envenenamento de humanos e animais, principalmente silvestres, resultantes da ingestão de alimentos contaminadas (Friberg et al., 1974). Em adição, o cádmio tem meia-vida de aproximadamente 10 anos, o que o torna um contaminante cumulativo (Waalkes, 2000). Além disso, atualmente, o cádmio tem sido alvo de muitos estudos, já que figura entre os metais que têm apresentado os mais altos níveis de emissão para o meio ambiente nas últimas décadas (Nascimento e Pereira, 1997).

2.1.2. Toxicidade do Cádmio

O contato com poluentes ambientais contendo o elemento cádmio pode ocorrer mesmo que não se resida ou se trabalhe em áreas geográficas altamente poluídas. O público em geral pode ser exposto ao cádmio, predominantemente, por meio da água e alimentos contaminados, mas também pela inalação da fumaça de cigarros. No entanto, a alimentação é a principal fonte de contaminação, onde cerca de 70% da exposição

ocorre por via oral, decorrente da utilização de águas contaminadas na irrigação ou mesmo pelo solo contaminado (Prasad, 1995).

As concentrações de cádmio nos alimentos ocorrem, em ordem decrescente, maiores nos vegetais, depois em carnes e pescados e, finalmente, nos ovos e produtos lácteos (Garcia e Hernández, 1993).

O cádmio é um elemento químico altamente tóxico para seres humanos, podendo ser absorvido através dos tratos respiratório e intestinal. A intoxicação aguda tem como conseqüências náuseas, salivação, vômitos, dores abdominais e diarreia. A intoxicação crônica pode levar a disfunção renal, anemia, bronquite crônica, enfisema pulmonar, arteriosclerose, hipertensão e câncer (Bernard e Lauwerys, 1984; Hallenbick, 1984).

No homem e em animais, o cádmio é absorvido pelo intestino em duas fases, inicialmente através das células da mucosa intestinal e a seguir passa à circulação sanguínea através dos enterócitos, sendo transportado pelo sangue até o fígado onde induz a síntese da metalotioneína, uma proteína quelante de metais pesados que seqüestra o cádmio nas células hepáticas, proporcionando uma pequena liberação do complexo cádmio-metalotioneína no sangue. Tal complexo é filtrado pelos glomérulos e reabsorvido pelos túbulos proximais, podendo ser degradado por enzimas lisossomais das células tubulares renais, ou concentrar-se em vários órgãos como, rins, fígado, sistema nervoso, intestinos, ossos, pele e testículos comprometendo o perfeito funcionamento dos mesmos (Groten e Blanderen, 1994).

Adicionalmente, o cádmio foi designado um carcinógeno humano e um potente carcinógeno animal pela “International Agency for Research on Cancer” e o “US National Toxicology Program”. A exposição ocupacional ao cádmio está diretamente associada ao câncer de pulmão e possivelmente câncer de próstata (Roman et al., 2002).

A toxicidade do cádmio também pode afetar o crescimento das plantas, a redução da taxa de fotossíntese e provocar alterações nas atividades enzimáticas, possivelmente devido a sua afinidade pelos grupos cisteínas das proteínas (Coobet, 2000).

Além do potencial de causar danos aos seres humanos, animais e vegetais o cádmio também apresenta toxicidade para uma grande variedade de organismos, destacando-se os microrganismos onde os principais efeitos ocorrem sobre o crescimento e processo de replicação do ácido desoxirribonucléico (Koropatnick e Leibbrandt, 1995). Além do mais, os íons metálicos podem ainda acarretar mudanças na permeabilidade celular, inibição da síntese protéica e interferir nos processos respiratórios (Bononi, 1998). Adicionalmente, metais pesados têm marcantes efeitos na ultra-estrutura dos microrganismos, nos quais se observa alterações de forma e tamanho da célula e das organelas (Nishikawa, 2003).

O cádmio, particularmente, inibe as funções das proteínas que possuem pontes dissulfeto por causa de sua afinidade pelos grupos sulfidrilas. Além do mais, o cádmio compete com vários íons divalentes como Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} por sítios de ligação de metais nos sistemas biológicos. Este metal, pode ainda ligar-se a nucleotídeos levando a quebra da fita de ADN (Wang et al., 1997).

A contaminação do solo por metais pesados pode ocasionar alterações na diversidade microbiana, normalmente com seleção de microrganismos tolerantes, uma vez que algumas espécies podem ser eliminadas, enquanto outras podem aumentar o tamanho da população (Giller et al., 1998).

2.1.3. Interação dos Microrganismos com Metais Pesados

Os microrganismos exibem alta capacidade de crescer em elevadas concentrações de metais. Esta habilidade pode ser resultado de diversos mecanismos intrínsecos ou induzidos, bem como de fatores ambientais, que podem reduzir a toxicidade dos metais (Gomes et al., 1998). Frequentemente, os termos resistência e tolerância são usados como sinônimos. Gadd (1992) definiu resistência como a habilidade de sobreviver a metais tóxicos por mecanismos de detoxificação produzidos em resposta direta ao metal. A tolerância, por outro lado, seria a habilidade de sobreviver à toxicidade de metais por meio de propriedades intrínsecas do organismo.

Os microrganismos desenvolveram diferentes mecanismos de resistência/tolerância aos metais pesados, dentre os quais: seqüestro intra e extracelular; bombas de efluxo; redução e deposição enzimática conforme Figura 1 (Birch e Bachofen, 1990; Gomes et al., 1998; Nies, 1999). Qualquer um desses processos resulta em diminuição da toxicidade do metal.

Comumente a tolerância/resistência dos microrganismos a metais pesados está diretamente relacionada à capacidade de acumulação. Os processos de acumulação de metais por microrganismos podem ou não depender do metabolismo. Microrganismos possuem dois mecanismos distintos de acumulação de metais. O primeiro envolve a adsorção físico-química à superfície celular, constituindo um processo independente do metabolismo que é denominado de “biossorção”. O segundo é exclusivamente dependente do metabolismo celular e envolve transporte ativo dos metais para o interior da célula, sendo conhecido como “bioacumulação” (Gomes et al., 1998; Kapoor e Viraraghavan, 1995).

Dessa maneira, a detoxificação de metais via bioacumulação é baseada em sistemas de transporte. Em bactérias, o cádmio é internalizado pelo sistema de

transporte do magnésio, enquanto que em plantas o cádmio entra pelo sistema de transporte do cálcio. Em *Sacharomyces cerevisiae*, cádmio é ligado pela glutatona, resultando no complexo cádmio-bis-glutationato, o qual é transportado para o interior de vacúolos (Nies, 1999).

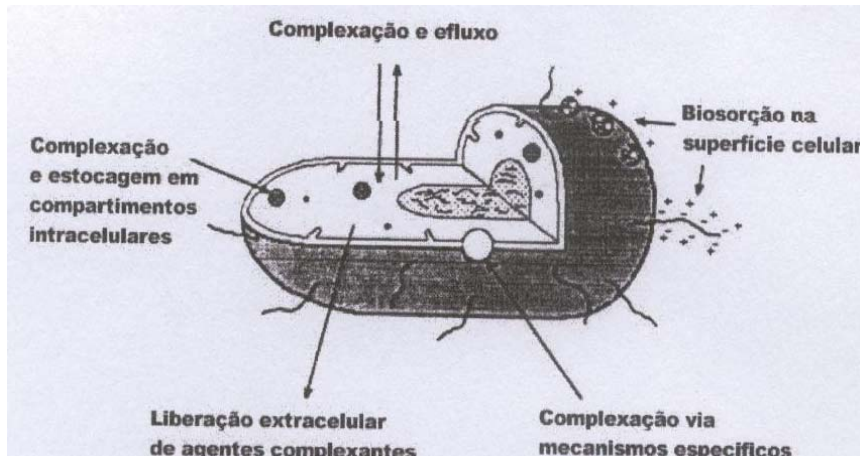


Figura 1. Esquema resumido dos mecanismos de interação entre metais e microrganismos. Fonte: Birch e Bachofen, 1990.

O fenômeno de biossorção está intimamente relacionado à superfície celular e varia significativamente entre grupos, gêneros e espécies de microrganismos. A predominância de grupos carregados negativamente em vários biopolímeros que formam a parede celular confere um caráter aniônico à superfície celular, resultando na atração passiva dos íons de metais a mesma. Sendo assim, a ligação dos íons metálicos ocorre por interações eletrostáticas destes com grupos funcionais (OH^- , HPO_4^{2-} , R-COO^- , $-\text{SH}^-$, NH_2^-) presentes em carboidratos, lipídios e proteínas da superfície celular (Gomes et al., 1998; Vieira e Volesky, 2000). Atualmente, a biossorção é o processo mais usado na biorremediação de metais pesados, sendo muito eficiente no tratamento de efluentes, porém seu potencial em solo é menos avançado (Barkay e Schaefer, 2001).

A bioacumulação é um processo mais lento do que a biossorção e pode ser inibida pela ausência de nutrientes tais como glicose, nitrogênio e fósforo, e pela ação

de inibidores metabólicos e fatores ambientais (Gomes et al., 1998). Este processo de acumulação de metais envolve tanto mecanismo passivo quanto ativo, pois os íons metálicos precisam ligar-se a parede celular para depois serem internalizados (Malik, 2004).

Enquanto a bioissorção é um fenômeno que ocorre em microrganismos vivos e mortos, a bioacumulação é apenas mediada por microrganismos vivos. Sendo assim, a bioacumulação é um processo dependente do crescimento, em contraste com a bioissorção que é crescimento independente (Gupta et al., 2000). Em adição, células vivas podem interagir de diversas formas com metais, tanto por mecanismos passivos, utilizados por células mortas, quanto por mecanismos que requerem atividade metabólica (Gomes et al., 1998).

Os processos de bioacumulação apresentam algumas vantagens em relação à bioissorção no tocante a sua utilização em biorremediação de metais pesados, como capacidade de remoção contínua de metais e potencial de otimização através do desenvolvimento de espécies mais resistentes (Malik, 2004).

2.2. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS DE REMOÇÃO DE METAIS PESADOS

O termo biotecnologia pode ser conceituado como a utilização de sistemas biológicos para a obtenção de produtos e ou serviços de interesse econômico ou social. A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. As etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com as características desejadas, seleção final das melhores amostras e

culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (Bull et al, 2000).

A biotecnologia é reconhecida como uma das tecnologias promissoras no século 21, devido ao seu potencial de solucionar problemas globais através de produtos, serviços e ou processos para saúde, produção de alimentos e poluição ambiental, bem como à promessa de desenvolvimento industrial sustentável através da utilização de recursos renováveis (Bull et al., 1998).

A biotecnologia aplicada ao meio ambiente, embora ainda considerada uma área de pesquisa emergente, mostra-se potencialmente capaz de responder com soluções efetivas para uma grande variedade de problemas relativos à poluição ambiental. Nesse sentido, não apenas proporciona métodos para o tratamento de rejeitos industriais, mas também pode contribuir para a biorremediação de ambientes já contaminados. Adicionalmente, pode ainda viabilizar o aproveitamento destes rejeitos para produção de materiais de interesse econômico (Kapoor e Viraraghavan, 1995; Gomes et al., 1998).

Já está bem estabelecida, a aplicação biotecnológica de microrganismos tanto de origem natural como geneticamente modificados, os quais apresentam a capacidade de transformar alguns produtos em novas substâncias, mais valiosas ou ainda transformar resíduos poluentes em substâncias inofensivas, e algumas vezes úteis. Este aspecto da microbiologia é de suma importância, principalmente em relação ao desenvolvimento de processos de recuperação ambiental e tem revolucionado a microbiologia industrial, através do desenvolvimento de processos comerciais denominados de “Biorremediação” que permitem a utilização de um elevado número de microrganismos com habilidade de decompor e remover diversos poluentes químicos (Pelczar, 1996).

2.2.1. Biorremediação

A Biorremediação é um processo tecnológico pelo qual sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação e/ou bioissorção de poluentes. Existem várias formas de biorremediação: a) Bioestimulação, estimulação dos microrganismos presentes no local através do controle das condições de crescimento, como adição de nutrientes. b) Bioaugmentação, introdução de microrganismos previamente isolados de outros locais ou do mesmo local da contaminação, com a habilidade de eliminar o poluente. c) Remediação utilizando metabólitos microbianos, como enzimas e surfactantes capazes de imobilizar o contaminante. A biorremediação tem recebido grande atenção atualmente, devido a sua importância econômica e promissora aplicação na indústria.

Embora, todo material biológico demonstre habilidade para captação de metais, várias pesquisas vêm sendo direcionadas para o uso de sistemas microbianos, onde tanto a biomassa viva quanto inativada (morta) são empregadas. Muitos microrganismos, incluindo bactérias, algas e fungos, possuem a habilidade para remover metais pesados do meio ambiente. A capacidade de remoção, assim como, o mecanismo de acumulação pode variar amplamente de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo a linhagem. Células, produtos excretados, parede celular e polissacarídeos têm potencial para remover metais de solução. Fatores externos como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade de acumulação (Cotoras, 1992; Nakajima e Sakagushi, 1986).

Na área de tratamento de efluentes líquidos existe um grande potencial para a exploração principalmente de bactérias, fungos e algas. A remoção de metais empregando microrganismos selecionados tem se tornado bastante promissora, já que os

mesmos podem apresentar alta seletividade e alta taxa de remoção. Seu emprego também apresenta a vantagem de possuírem potencial para regeneração da biomassa, possibilitando a reutilização em novas etapas de remoção, após a recuperação do metal captado (Gallun et al., 1987; Volesky e Hollan, 1995).

Entre os sistemas biológicos utilizados, os fungos são de grande interesse biotecnológico, sendo, dentre os seres vivos, os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem estar da humanidade. Os fungos são organismos que apresentam marcante versatilidade metabólica, característica que permite o seu desenvolvimento em condições ambientais adversas, como pH baixo, altas temperaturas, alta salinidade e presença de substâncias tóxicas tais como metais pesados. Além do que, os fungos são mais tolerantes a metais pesados do que as bactérias (Rajapaksha et al., 2004). O somatório destas características faz dos fungos filamentosos importantes agentes na remediação de áreas contaminadas com metais tóxicos (Griffin, 1994; Bononi, 1998).

Estes microrganismos podem ainda apresentar-se morfológicamente como leveduriforme ou filamentosos. Esta última forma acrescenta aos fungos a vantagem de utilização em biorremediação de solos contaminados, pois permitem a fácil penetração do fungo no solo e sua interação com o poluente (Espósito e Azevedo, 2004).

2.2.2. *Cunninghamella elegans*

O gênero *Cunninghamella* é um dos mais importantes pertencentes à Ordem Mucorales, foi descrito por Matruchot em 1903 como um fungo filamentoso que poderia ser encontrado em solo, materiais de origem vegetal ou outros substratos orgânicos. As principais espécies representantes do gênero são *Cunninghamella bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata*, sendo esta última à única considerada

potencialmente patogêna, podendo causar infecções em hospedeiros imunologicamente comprometidos (Alexopoulos et al., 1996).

Em especial, *C. elegans* Lendner 1905, tem sido indicada por muitos autores como um fungo modelo capaz de metabolizar uma ampla variedade de compostos tóxicos recalcitrantes utilizando a fase I (oxidativa) e fase II (conjugativa) (Ambrósio e Campos-Takaki, 2004). Esta espécie tem sido extensivamente utilizada como modelo microbiológico para o metabolismo de drogas farmacêuticas para células animais através do sistema de enzimas citocromo P-450 (Zhang, 1996); na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs (Shiosaki et al., 2001), na biodegradação de azocorantes utilizados na indústria têxtil (Ambrósio e Campos-Takaki, 2004), na biodegradação de produtos tóxicos advindos da combustão de óleo diesel (Shiosaki et al., 2001; Cerniglia e Gibson, 1977), e na biorrecuperação de metais pesados (Franco et al., 2004). *C. elegans* pode ainda ser utilizada como fonte alternativa para a produção de quitina e quitosana apresentando rendimentos iguais ou superiores aos obtidos com a utilização de fontes tradicionais de obtenção, como as carapaças de crustáceos (Andrade et al., 2000; Franco et al., 2004;).

2.3. POLIFOSFATO INORGÂNICO

2.3.1. Considerações Gerais

Um grande número de organismos incluindo bactérias, fungos, plantas e animais estocam energia na forma de um polímero de fosfato, que pode conter de três a milhares de unidades repetidas de fosfato, o qual é denominado de polifosfato inorgânico (PoliPi) (Kulaev, 2000).

O primeiro isolamento de PoliPi originado de microrganismos ocorreu no final do século dezoito, quando Libermann obteve, a partir de biomassa de leveduras uma

substância que se assemelhava à forma de grânulos de volutina ou metacromáticos e por isso, denominou-os equivocadamente de “metafosfatos” (Harold, 1966).

Estruturalmente, o PoliPi foi descrito como um homopolímero de ortofosfatos unidos através de ligações fosfoanidrido que termodinamicamente são consideradas de alta energia. Cada átomo de fósforo é ligado ao vizinho através de dois átomos de oxigênio, formando uma cadeia linear. O grau de polimerização pode apresentar valores de duas a milhares de unidades de fosfato (Kulaev et al., 2004).

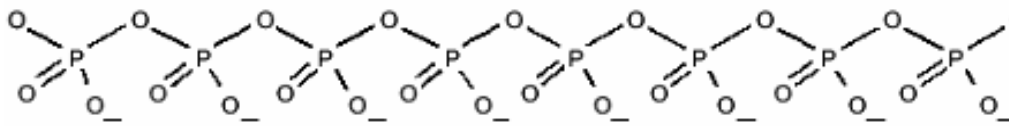


Figura 2. Estrutura química do polifosfato inorgânico.

Fonte: Reusch, 2000.

Em eucariotos, o PoliPi ocorre principalmente no citoplasma, na superfície celular, no periplasma e na membrana plasmática (Kulaev, 1979). A diferença básica entre as células eucarióticas e procarióticas, é o melhor desenvolvimento da compartimentalização de processos bioquímicos que ocorre em eucariotos, nos quais estes processos ocorrem em organelas especializadas. Assim como nas bactérias, em eucariotos o PoliPi está localizado em todos os compartimentos celulares estudados (Kulaev e Kulakovskaya, 2000).

Vários relatos científicos fundamentam a presença de polifosfato inorgânico em todos os tipos de células, o que sugere uma função biológica fundamental à vida, estando a sua função dependente da sua quantidade, localização celular, tamanho da cadeia e fonte biológica (Kornberg e Ault-Riche, 1999; Kumble e Kornberg, 1995).

Dentre as suas funções podem ser destacadas: 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 estresse ambiental e na adaptação a fase estacionária de crescimento (Wood e Clarck, 1988; Kulaev e Kulakovskaya, 2000; Kornberg et al., 1999).

O acúmulo de PoliPi pelos microrganismos apresenta várias implicações biotecnológicas, médicas e industriais. Um desses processos envolve o acúmulo de polifosfato por microrganismos submetidos a ciclos alternados anaeróbicos/aeróbicos. Este fenômeno é a base do processo de tratamento de efluentes contaminados com fosfato, designado de “remoção melhorada de fosfato biológico” (Kulaev, 2000).

Por outro lado, estudos recentes mostraram que uma mutação no gene que codifica a polifosfatocinase (ppK), enzima 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 (Rashid e Kornberg, 2000).

Além disso, a seqüência gênica que codifica a produção da polifosfatocinase em diversas espécies bacterianas apresenta alto grau de conservação e pode ser considerado um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas, pois a homologia para células animais não tem sido observada (Kornberg et al., 1999).

A lista de microrganismos patógenos que apresentam a seqüência conservada é ampla, destacando-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros (Rashid et al., 2000).

2.3.2. Papel do Polifosfato Inorgânico na Tolerância a Metais Pesados

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 (Campos Takaki et al., 1983; Greenfield et al., 1987; Ohtomo et al., 2004). A partir destes estudos a composição química dos grânulos de polifosfato foi determinada, evidenciando além da presença de fósforo, a de muitos metais tais como: Na, K, Ca, Mg, Zn, Ba e Al. Tais análises suscitaram a dedução de que o polifosfato pode estar envolvido na quelação de metais (Wood e Clarck, 1988). A capacidade de quelação de metais do ambiente se deve às propriedades polianiónicas do polifosfato (Kornberg et al., 1999).

Sendo assim, a relação entre PoliPi e estoque/tolerância/detoxificação de metais pesados tem sido descrita nos últimos anos por muitos autores. Aiking et al., (1984) demonstraram que *Klebsiella aerogenes* acumula fósforo durante crescimento na presença de cádmio. Em *Staphylococcus aureus*, o PoliPi está envolvido na remoção de níquel (Gonzalez e Jensen, 1998). Adicionalmente, Pan-Hou et al., (2002) indicam que o polifosfato está envolvido na resistência ao metal mercúrio e Suresh et al., (1986) observaram que o polifosfato de superfície de *Acinetobacter lwoffii* é degradado em resposta ao cádmio.

Entretanto, evidências sugerem que o PoliPi é degradado durante crescimento na presença de metais pesados (Keasling e Hupf, 1996). Por outro lado, Keasling et al., (1998) afirmam que a habilidade de síntese e degradação do PoliPi é mais importante para tolerância aos metais pesados do que apenas a capacidade de acumular grande quantidade de polifosfato intracelular como sustentam alguns estudos.

Um mecanismo acerca da participação do PoliPi no processo de detoxificação de metais pesados foi proposto por Keasling (1997), onde o PoliPi presente na membrana celular seqüestraria o íon metálico e o transportaria para dentro da célula. Por outro lado, a entrada do metal pesado na célula estimula a atividade de exopolifosfatases, as quais liberam Pi a partir do PoliPi formando um complexo metal-fosfato que é uma molécula inerte podendo permanecer dentro ou ser transportada para fora da célula. Recentes estudos com diferentes microrganismos têm corroborado esta hipótese (Alvarez e Jerez, 2004; Remonsellez et al., 2006).

A aparente relação entre a presença de PoliPi e o incremento da resistência aos metais pesados indicam fortemente o potencial de utilização de organismos, selvagens ou modificados geneticamente para o acúmulo de polifosfato, no processo de biorremediação de ambientes contaminados com tais poluentes (Keasling et al., 2000).

2.4. ULTRA-ESTRUTURA E CITOESQUELETO DE ACTINA

Os fungos são constituídos pelos principais componentes encontrados nos demais organismos eucarióticos, não apresentando plastos de qualquer natureza. As organelas dos fungos são similares às daquelas dos demais eucariotos e incluem núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, vacúolos, ribossomos, Golgi, inclusões lipídicas e corpos eletrondensos (Carlile e Watkinson, 1996).

A superfície celular dos fungos é composta por três matrizes contíguas e interconectadas: componente capsular ou exocelular, a parede celular e a membrana plasmática. A bicamada lipídica é composta de fosfolipídios e quantidade substancial de proteínas e esteróis (Griffin, 1994).

Aspectos ultraestruturais de fungos têm sido elementos fundamentais na pesquisa sobre desenvolvimento e germinação de esporos, interação hospedeiro-

patógeno, comportamento nuclear, estudos de organelas, assim como no conhecimento das relações entre estruturas e funções. Por conseguinte, a microscopia eletrônica tem contribuído sobremaneira na elucidação de diversos aspectos morfológicos e citoquímicos (Mims et al., 2001 e 2002; Shari'a et al., 2002; Nascimento et al., 2000; Lima et al. 2003).

Desde as primeiras pesquisas ultraestruturais, os micologistas têm acompanhado o desenvolvimento das diversas metodologias em todas as áreas da microscopia eletrônica, e as têm usado como instrumentos geradores de informações sobre a estrutura de fungos. Sendo assim, aspectos morfológicos ao nível ultra-estrutural juntamente com dados fisiológicos e bioquímicos possibilitarão maior entendimento sobre os diversos grupos de fungos (Klomprens, 1990). Nos últimos anos a microscopia eletrônica vem sendo usada no entendimento da interação dos fungos com o seu meio e suas formas de adaptação ao estresse ambiental.

Estudos sobre a distribuição e arranjos dos integrantes do citoesqueleto em diferentes tipos celulares, têm recebido muita atenção atualmente. Em fungos, os estudos sobre citoesqueleto, mostram que a microscopia óptica tem possibilitado mais resultados positivos do que a microscopia eletrônica. Na microscopia óptica a utilização da faloidina, proteína que tem alta afinidade pela actina, complexada ao isotiocianato de fluoresceína, permite a observação daquele filamento "*in situ*". Os elementos do citoesqueleto podem estar envolvidos na motilidade de organelas ou atuam direcionando o movimento de vesículas (Carlile e Watkinson, 1996).

Três tipos básicos de filamentos de proteínas são responsáveis pelas atividades do citoesqueleto: filamentos de actina; microtúbulos e filamentos intermediários. Cada tipo de filamento é formado por diferentes subunidades protéicas: actina (filamentos de actina); tubulina (microtúbulos) e uma família de proteínas fibrosas relacionadas –

vimentina ou laminina (filamentos intermediários) (Alberts et al., 1994). Os fungos apresentam elementos do citoesqueleto, mas suas funções não estão completamente elucidadas. Entre os componentes do citoesqueleto, a actina parece ser o mais importante para o crescimento apical em levedura e fungos filamentosos (Heath, 1990).

Actina tem sido localizado em fungos filamentosos por métodos citoquímicos e imunocitoquímicos em sítios de formação de parede tais como ápice de hifas e em locais de formação de septos (Czymmek et al., 1995; Srinivasan et al., 1996).

Dessa forma, estudos que melhorem o conhecimento e a compreensão acerca do comportamento de microrganismos em resposta a metais pesados são fundamentais o desenvolvimento das pesquisas em biorremediação.

3. REFERÊNCIAS

Aguiar, M.R.M.P., Novaes, A.C., 2002. Remoção de Metais Pesados de Efluentes Industriais por Aluminossilicatos. *Química Nova* 25 (6), 1145-1154.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland publishers, 1294.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., 1996. *Introduction to Mycology*. John Wiley & Sons, New York: p. 61-63.

Alvarez, S., Jerez, C.A., 2004. Copper Ions Stimulate Polyphosphate Degradation and Phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9), 5177-5182.

- Ambrósio, S. T., Campos-Takaki G. M., 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresource Technology* 91, 69-75.
- Aiking, H., Stijnman, A., Garderen, C.V., Heerikhuizen, H. V., Riet, J.V., 1984. Inorganic Phosphate Accumulation and Cadmium Detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 Growing in Continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (2), 374-377.
- Andrade, V.S., Neto, B.B., Souza, W., Campos-Takaki. G.M., 2000. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1042-1045.
- Barkay, T., Schaefer, J., 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology* 4, 318-323.
- Bernard, A., Lauwerys, R., 1984. Cadmium in human population. *Experientia* 40 (2), 143-152.
- Birch, L., Barchofen, R., 1990. Complexing agents from microorganisms. *Experientia* 46 (7), 827-834.

- Bononi, V.L.R., 1998. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica – Secretaria de Estado do Meio Ambiente: São Paulo.
- Bull, A. T., Marrs, B.L., Kurane, R., 1998. Biotechnology for clean industrial products and processes. p. 1-200. *In: Towards industrial sustainability*. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3), 573–606.
- Campos Takaki, G.M., Beakes, G.W., Dietrich, S.M., 1983. Electron microscopy X-ray microprobe and cytochemical study of isolated cell walls of mucoralean fungi. *Transaction of British Mycological Society* 80.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., 1996. *The Fungi*. Tokyo, Academic Press. p. 385.
- Czymmek, K. J., Bourett, T. M., Howrad, R. J., 1995. Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrilate de-embedment. *Journal of Microscopy* 181, 153-161.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., 1977. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Applied Environmental Microbiology* 34, 363-370.

- Coobet, G.P., Sands, K., Walter, M., Wixson, B.G., Doward-King, E., 2000. Accumulation of Heavy Metals by Vegetables Grown in mine wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (3), 600-607.
- Cotoras, D., 1992. Sorption of metal ions by whole cells of *Bacillus* and *Micrococcus*. *Environmental Technology* 13, 551-559.
- Esposito, E., Azevedo, J.L., 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Educs, Caxias do Sul.
- Fellenberg, G., 1990. Introdução aos problemas da poluição ambiental. Ed. Pedagógica e Universitária. São Paulo.
- Franco, L.O., Maia, R.C.C., Porto, A.L.F., Messias, A.S., Fukushima, K., Campos Takaki, G.M., 2004. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 243-247.
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F., Kjellström T., 1974. Cadmium in the Environment. 2nd ed. Cleveland: CRC Press.
- Freitas, C.M., Porto, M.F.S., Pivetta, F., Moreira, J.C., Machado, J.M.H., 2001. Poluição química ambiental – um problema de todos, que afeta alguns mais do que os outros. *Bahia Análise e Dados* 10 (4), 260-270.

- Gadd, G., 1992. Metals and Microorganisms: A problem of definition. FEMS Microbiology Letters 100, 197-204.
- Galun, M., Galun, E., Siegel, B.Z., Sélér, P., Leer, H., Siegel, S.M., 1987. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. Air soil pollutants 33, 359-371.
- Garcia, M.M.; Hernández, M.T.P., 1993. Métodos para análisis directo de cadmio y plomo en muestras solidas por espectrometria de absorción atómica. Revista Cubana de Higiene e Epidemiologia 31(1), 38-42.
- Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. Soil Biology and Biochemistry 30, 1389-1414.
- Gonzalez, H., Jensen, T.E., 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. Microbios 93 (376), 179-185.
- Gomes, N.C.M., Mendonça-Hagler, L.C.S., Savaidis, I., 1998. Metal Biorremediation by Microorganisms. Revista de Microbiologia 29, 85-92.
- Greenfield, N. J., Hussain, M., Lenard, J., 1987. Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a P-nuclear magnetic resonance study. Biochimica et Biophysica Acta 926, 205-214.

Griffin, D. H., 1994. *Fungal Physiology*. John Willey & Sons Incorporation, Publishers.

Groten, J.P., Blanderen, P.J., 1994. Cadmium bioavailability and health risk in food. *Trends Food Sciences Technology* 5, 50-55.

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K., Mohapatra, H., 2000. Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science* 78 (8), 967-973.

Hallenbick, W. H., 1984. Human health effects of exposure to cadmium. *Experientia* 40 (2), 136-140.

Harold, F.M., 1966. Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriology Review* 16, 772-794.

Hesseltine, C.W., Anderson, R.F., 1957. Microbiological Production of Carotenóides I. Zygosporé and Carotene produced by Intraspecific and crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. *Mycology* 49, 449-452.

Heath, I. B., 1990. The roles of actin in tip growth of fungi. *International Reviews of Cytology* 123, 95-127.

Hughes, M. N., Poole, R. K., 1989. *Metals and Microorganisms*. Londres: Chapman and Hall Ltd.

- Ikeda, M., Zhang, Z.W., Moon, C.S., Shimbo, S., 2000. Watanabe NH, Matsuda NI. Possible effects of environmental cadmium exposure on cadmium function in the Japanese general population. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 73(1), 15-25.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 53, 195-206.
- Keasling, J.D., Hupf, G.A., 1996. Genetic Manipulation of Polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 743-746.
- Keasling, J.D., 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Annals of the New York Academy of Sciences* 829 (1), 242-249.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Pramanik, J., 1998. Engineering polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*: Implications for bioremediation of inorganic contaminants. *Biotechnology and Bioengineering* 58 (2-3), 231-239.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Trelstad, P., Renninger, N., McMahon, K., 2000. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)* 65, 385-393.

- Klomparens, K.L., 1990. Development and application of ultrastructural research in mycology. *Mycopathologia* 109, 139-148.
- Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riche, D., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* 68, 89-125.
- Koropatnick, J., Leibbrandt, M.E.I., 1995. Effects of Metals on Gene Expression. In: *Handbook of Experimental Pharmacology - Toxicology of Metals Biochemical Aspects* (R.A. Goyer, and M.G. Cherian), pp. 93-120. Berlin, New York: Springer-Verlag.
- Kulaev, I., Kulakovskaya, T., 2000. Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Review of Microbiology* 54,709-734.
- Kulaev, I.S., 1979. *The biochemistry of inorganic polyphosphate*, John Wiley & sons, N.Y. pp. 202-206.
- Kulaev, I.S., 2000. *Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates*. *Biochemistry (Moscow)* 65,269-270.
- Kumble, K.D., Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *Journal of Biology Chemical* 270, 5818-5827.

- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M., 2003. Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, 363-372.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261-278.
- Malavolta, E., 1994. Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados – mitos, mistificação e fatos. *Produquímica*, São Paulo p.153.
- Mims, C. W., Rodriguez-Lothar, C., Richardson. E. A., 2002. Ultrastructure of the host-pathogen interface in daylily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma* 219 (3-4), 221-226.
- Mims, C. W., Rodriguez-Lothar, C., Richardson. E. A., 2001. Ultrastructure of the host-parasite interaction in leaves of *Duchesnea indica* infected by the rust fungus *Frommeëla mexicana* var. *indicae* as revealed by high pressure freezing. *Canadian Journal of Botany* 79(1), 49–57.
- Nascimento, C.W.A., Pereira, J.B.M., 1997. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32 (12), 1303-1308.

- Nascimento, A.E., Shari'a, A.E.N., Lima, M.A.B., Campos-Takaki, G.M., 2000. A cytochemical study of acid carbohydrates on the surface of *Candida lipolytica* grown in tween 80-containing medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 31, 30-36.
- Nakajima, A., Sakagushi, T., 1986. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, 59-64.
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology Biotechnology* 51, 730-750.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 253-259.
- Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Mimura, T., Saito, M., Ezawa, T., 2004. Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. *Analytical Biochemistry* 328, 139-146.
- Pan-Hou, H., Kiyono, M., Omura, H., Omura, T., Endo, G., 2002. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. *FEMS Microbiology Letters* 10325, 159-164.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R., 1996. *Microbiologia*. Makron Books do Brasil Ltda, 2^a ed., V. 1, p.524.

- Prasad, M.N.V., 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* 35 (4), 525-545.
- Rajapaksha, R.M.C.P., Tobor-Kaplon, M.A., Baath, E., 2004. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5), 2966–2973.
- Rashid, M.H., Kornberg, A., 2000. Inorganic Polyphosphate is Required for Motility of Bacterial Pathogens. *Journal of Bacteriology* 182 (1), 225-227.
- Reusch, R.N., 2000. Transmembrane ion transporte by polyphosphate/poly-(R)-3-hidroxi-butirato complexes. *Biochemistry (Moscow)* 65 (3), 335-352.
- Remonsellez, F., Orell, A., Jerez, C.A., 2006. Copper tolerance of the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* 152, 59-66.
- Roman, T.R.N., Lima, E.G., Azoubel, R., Batigália, F., 2002. Toxicidade do Cádmio no Homem. *HB Científica* 9 (1), 43-48.
- Shari'a, A.E.N., Nascimento, A.E., Lima, M.A.B., Campos-Takaki, G.M., Souza, W., 2002. Polyphosphate in zygomycetes: a cytochemical study. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 119-126.

- Shari'a, A.E.N., Nascimento, A.E., Campos-Takaki, G.M., 1999. Actin cytoskeleton structure and its localization in *Gongronella butleri*, *Mucor javanicus* and *Absidia cylindrospora* (Mucorales – Zygomycetes). Boletín Micológico 14, 1-7.
- Shiosaki, R. K., Okada, K., Gusmão, N.B., Nigam, P., Falcão, P.S., Silva, N.H., Fukushima, K., Miyaji, M., Campos-Takaki, G.M., 2001. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. Revista Iberoamericana de la Micología 18, 123-127.
- Souza, P.M., Marinho, P.H., Lima, M.A.B., 2005. Copper Influence on polyphosphate metabolism of *Cunninghamella Elegans*. Brazilian Journal of Microbiology 36, 315-320.
- Srinivasan, S., Vargas, M. M., Roberson, R. W., 1996. Functional, organizational, and biochemical analysis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. Mycologia 88, 57-70.
- Suresh, N., Roberts, M.F., Coccia, M., Chikarmane, H.M. and Halvorson, H.O., 1986. Cadmium induced loss of surface polyphosphate in *Acinetobacter lwoffii*. FEMS Microbiology Letters 36, 91-94.
- Vieira, R.H.S.F., Volesky, B., 2000. Biosorption: a solution to pollution?. International Microbiology 3, 17-24.
- Volesky, B., Holan, Z. R., 1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress 11, 235-250.

- Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D., Clark, D.S., 1997. Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (10), 4075-4078.
- Wood, H.G., Clarck, J.E., 1988. Biological Aspects of Inorganic Polyphosphate. *Annual Reviews of Biochemistry* 57, 253-260.
- Waalkes, M.P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79, 241-244.
- Zhang, D., Freeman, J. P., Sutherland, J. B., Walker, A E., Yang, Y., Cerniglia, C. E., 1996. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 798-803.

PRIMEIRO ARTIGO

**TOXICIDADE DO CÁDMIO PARA *Cunninghamella elegans*:
ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS E DO CITOESQUELETO DE
ACTINA**

Trabalho submetido para publicação no periódico Journal of Basic Microbiology.

**TOXICIDADE DO CÁDMIO PARA *Cunninghamella elegans*:
ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS E DO CITOESQUELETO DE
ACTINA**

Marcos Antonio Barbosa de Lima ^{a, b}, Patrícia Mendes de Souza ^{a, b}

Aline Elebão do Nascimento ^a, Wanderley de Souza ^c

Galba Maria de Campos Takaki ^{a, b}

^a Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^c Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

No presente trabalho, *Cunninghamella elegans*, fungo filamentosso modelo para processos de degradação de xenobióticos, foi estudado quanto ao seu comportamento estrutural frente à presença de cádmio. Para tanto este fungo foi cultivado em presença de cádmio nas concentrações 5,62mg/L, 11,24mg/L e 22,10mg/L e submetidas ao estudo por microscopia óptica de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão, com uso das técnicas de rotina e citoquímica com vermelho de rutênio. Os resultados da microscopia de fluorescência revelaram diferenças nos padrões de actina, relativas à forma, ao arranjo e a distribuição. Por sua vez, a microscopia eletrônica de transmissão revelou alterações na estrutura fina das amostras, como espessamento das hifas, aumento da eletrondensidade, variações na estrutura citoplasmática, aumento de vacuolização e surgimento de inclusões e grânulos eletrondensos. A citoquímica para vermelho de rutênio revelou a presença de sítios de reação na superfície celular, bem como no citoplasma, demonstrando que ocorreu alteração na permeabilidade celular. Os resultados demonstram, pela primeira vez, os efeitos do cádmio sobre a ultraestrutura e o citoesqueleto de actina deste fungo.

Palavras-Chave: Toxicidade, *Cunninghamella elegans*; Cádmio; Ultraestrutura; Citoesqueleto de actina,

INTRODUÇÃO

Os microrganismos são hábeis em sua afinidade por metais, podendo acumulá-los, utilizando diversos mecanismos fisiológicos. Estudos no campo da biotecnologia incluem pesquisas com microrganismos biorremediadores de tais elementos químicos. Para remoção de metais de efluentes industriais ou domésticos em grande escala microrganismos altamente eficientes no seqüestro de íons metálicos como bactérias, fungos, actinomicetos e algas têm sido utilizados. A interação entre microrganismos e metais pesados pode ter inúmeras implicações para o meio ambiente (Volesky, 1995; Wang & Yang, 1996; Kratochvil & Volesky, 1998; Gravilesca, 2004).

Todos os organismos desenvolveram mecanismos para lidar com uma ampla variedade de situações de estresse. Existe uma quantidade substancial de dados acerca do comportamento de microrganismos sob condições de estresse induzido por metais sendo avaliados através de atividades enzimáticas, contagem celular, respiração, determinação de carbono e nitrogênio da biomassa. Os mecanismos para a aparente resistência/tolerância aos metais estão diretamente ligados aos processos metabólicos/fisiológicos. Deve ser ressaltado o papel da superfície celular nos mecanismos de interação com agentes externos para o estabelecimento do desenvolvimento celular (Gadd, 1993; Hall, 2002; Rosen, 2002; Nies, 1999).

Alguns estudos demonstram que metais pesados induzem o surgimento de alterações morfológicas em diferentes tipos celulares. A ação do cádmio varia de acordo com o tempo de incubação e a sua concentração. Tais modificações podem estar relacionadas a alterações na estrutura/permeabilidade da membrana citoplasmática, produzindo progressiva alteração de forma e perda de atividade metabólica. Adicionalmente, íons metálicos reconhecidamente induzem a despolimerização do

citoesqueleto de actina (Templeton, 2000; L'azou et al., 2002; Kumar & Prasad, 2004; Deckert, 2005; Zalizniak & Nugegoda, 2006).

O objetivo deste estudo foi examinar em *Cunninghamella elegans*, fungo amplamente utilizado como modelo para estudos de biodegradação/biotransformação de xenobióticos, as modificações induzidas pelo cádmio, ao nível celular, especialmente sobre o arranjo e a distribuição do citoesqueleto de actina, bem como sobre a estrutura fina com uso da técnica de rotina e citoquímica com vermelho de rutênio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e Condições de Cultivo – O isolado de *Cunninghamella elegans* IFM 46109, oriundo da coleção de culturas do Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University/Japan foi mantido em Batata Dextrose Agar (BDA) a 5^o C. O fungo foi repicado em meio BDA para produção de esporos e incubado a 28°C por 6 dias. Após este período, um total de 10⁵ esporos/mL foram coletados e inoculados no Meio Sintético para Mucorales (SMM) descrito por Hesseltine e Anderson (1957), acrescido de cloreto de cádmio contendo cádmio nas concentrações de 5,62 mg/L, 11,24 mg/L e 22,10 mg/L e incubados a 28°C sob agitação orbital de 150 rpm por 3 dias. Amostras controle foram crescidas no meio SMM sem cádmio nas mesmas condições descritas acima.

Histoquímica para Citoesqueleto de Actina - Amostras de culturas foram coletadas e lavadas em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2. Em seguida foram aderidas a lâminas de vidro cobertas com poli-L-lisina, durante 1 hora a 37^oC. As células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS por 30 minutos a 28°C. Seguindo-se novamente lavagem em tampão PBS, duas vezes. Posteriormente as amostras foram submetidas a permeabilização com uma solução contendo triton X100 0,1% em tampão PBS, durante 30 minutos a 28°C e incubada em Faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína, durante 15 horas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas com PBS, cobertas com solução de albumina 0,1% em PBS e as lâminas montadas com glicerina tamponada pH 9,2. As amostras assim preparadas foram observadas em Microscópio de Fluorescência OLYMPUS, BH2 e fotografadas.

Técnica de Rotina (De Souza, 2000) - Amostras coletadas com três dias de crescimento, oriundas dos meios de cultura com diferentes concentrações de cádmio, foram lavadas em solução salina tamponada, pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora, a 28°C. Finda a etapa de fixação, todas 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 0,1 M, durante 1 hora a 28°C, em condições de escuridão. Em seguida, as amostras foram, mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente destinadas ao processo de desidratação. Para a desidratação das amostras foi utilizada acetona, em proporções de 50%, 70%, 90% (intervalos de 5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Seguiu-se o processo de 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 a 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, JEOL CX-100.

Citoquímica para Detecção de Carboidratos de Superfície (Luft, 1971) - Após a coleta, as amostras foram lavadas em PBS por duas vezes durante 10 minutos, seguindo-se a fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 contendo vermelho de rutênio na concentração de 0,5 mg/mL, durante 1 hora, a 28°C. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 contendo

vermelho de rutênio na concentração de 0,5 mg/mL por três vezes durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 contendo vermelho de rutênio na concentração de 0,5 mg/mL durante 1 hora. Após esse intervalo as amostras foram, mais uma vez, lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 contendo vermelho de rutênio na concentração de 0,5 mg/mL. A partir deste ponto, as amostras foram submetidas aos processos de desidratação, embebição, emblocamento, ultramicrotomia, observação e fotomicrografias como descrito no item anterior.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com a microscopia óptica de fluorescência estão apresentados nas figuras 1-4. Os sítios de ligação do marcador faloidina-FITC aparecem como estruturas de alta fluorescência. A figura 1 apresenta hifas de *C. elegans* cultivadas em meio sem cádmio por três dias. Verificou-se, nas hifas submetidas à marcação com Faloidina-FITC, padrões diferenciados de forma, arranjo e distribuição do citoesqueleto de actina, com sítios de marcação fluorescente.

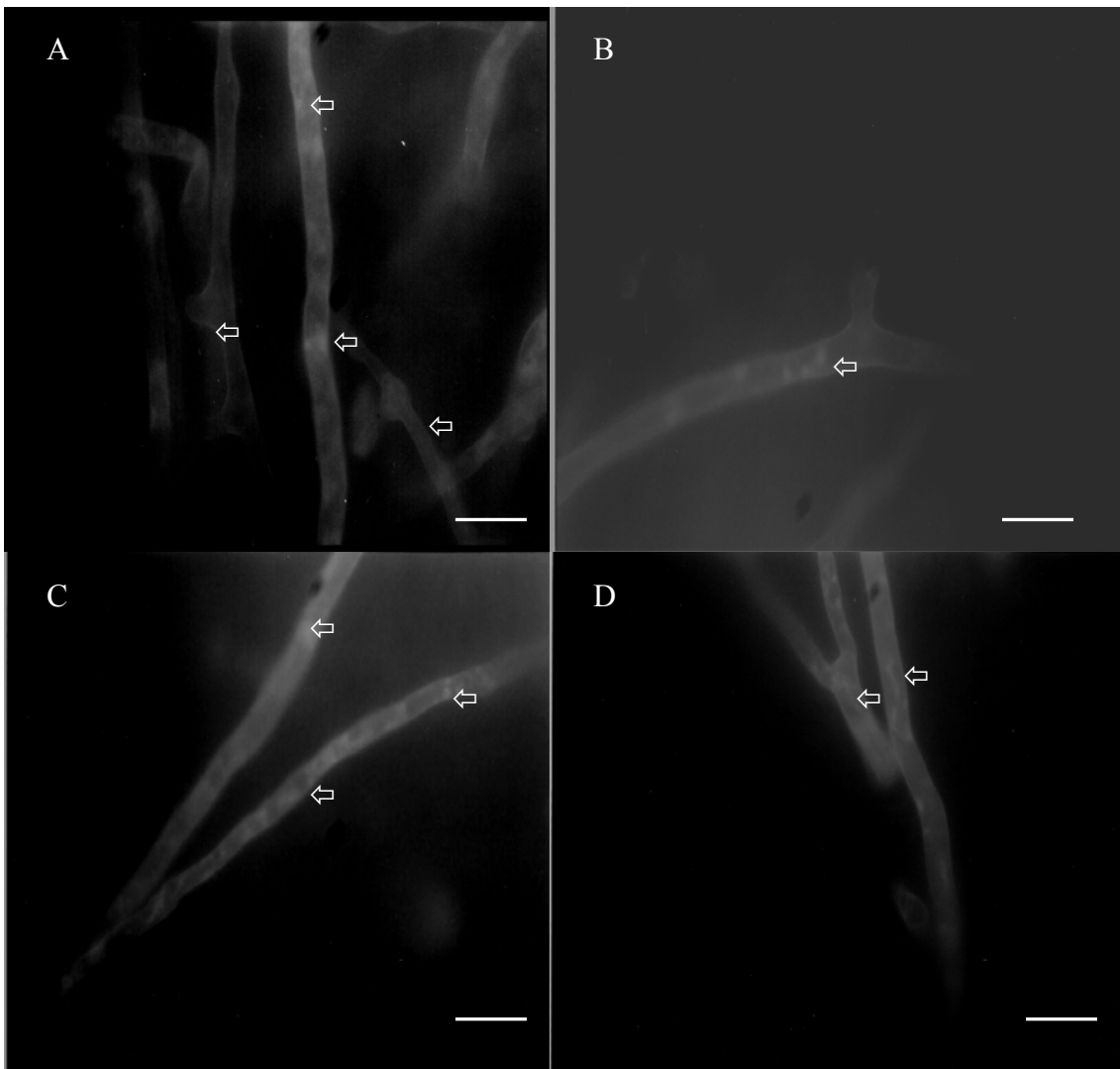


Figura 1. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* controle, tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos, filamentos e placas em diferentes áreas das hifas (⇐). Barra 10 μ m.

Pode-se observar fluorescência delineando as paredes celulares, ao longo das hifas, bem como uma marcação amorfa no citoplasma (figura 1A). Arranjos sob a forma de placas e filamentos são também visualizados (figuras 1A e D). Arranjos globulares e em grumos podem ser observados (Figuras 1B e C).

A análise das micrografias de hifas submetidas ao tratamento com 5,62 mg/L de cádmio permite verificar diferenças em comparação as hifas das culturas controle. Marcação fluorescente é observada na região citoplasmática associada à parede celular e essencialmente sob a forma de grumos e placas transversais ao longo das hifas (Figuras 2A-D)

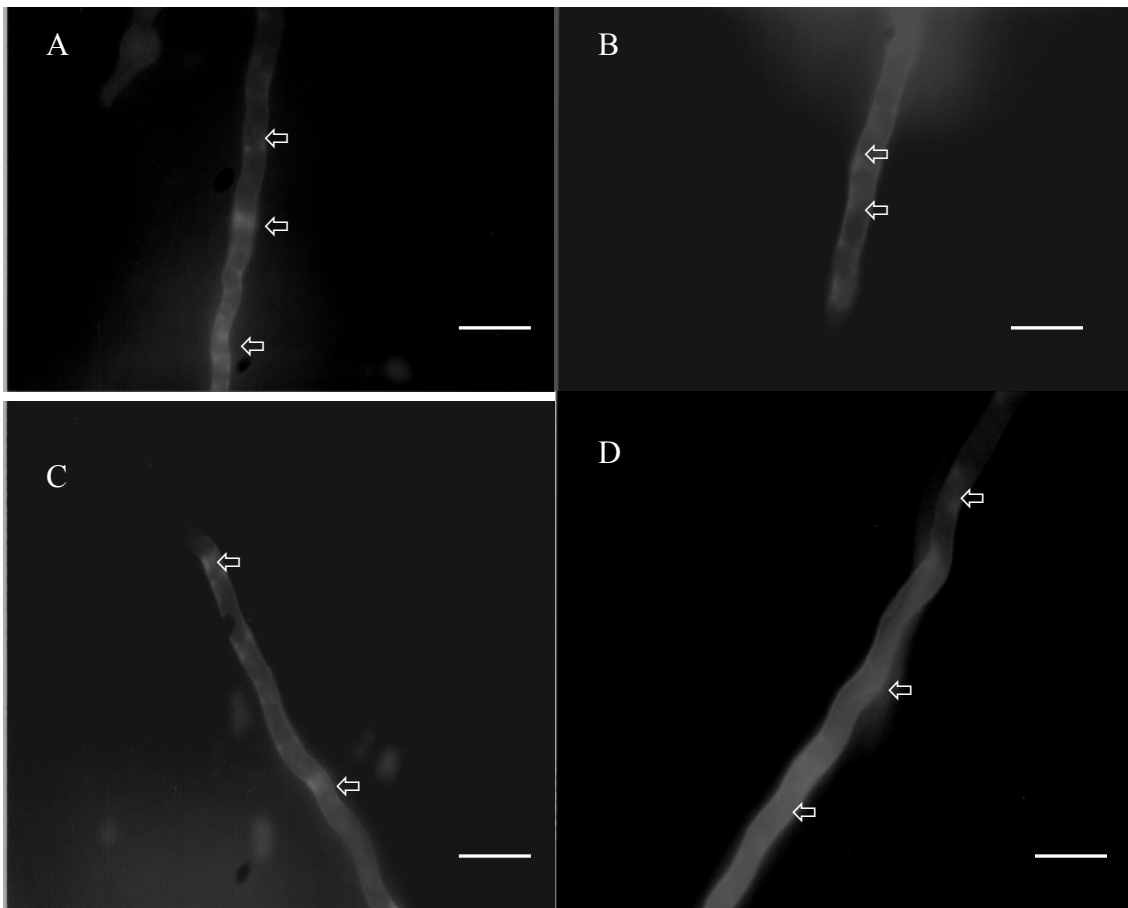


Figura 2. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* submetidas ao cultivo em presença de 5,62mg/L de cádmio, e tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos e placas em diferentes áreas das hifas (\Leftarrow). Barra 10 μ m.

Amostras de hifas submetidas a 11,24 mg/L de cádmio estão apresentadas na Figura 3A-C. É possível notar que a intensidade da fluorescência é menor do que àquelas apresentadas pelas hifas controle e hifas tratadas com 5,62 mg/L. Uma marcação mais amorfa ao longo da parede celular e sob a forma de pequenos grumos, assim como, filamentos delgados distribuídos irregularmente no citoplasma foi visualizada nas micrografias.

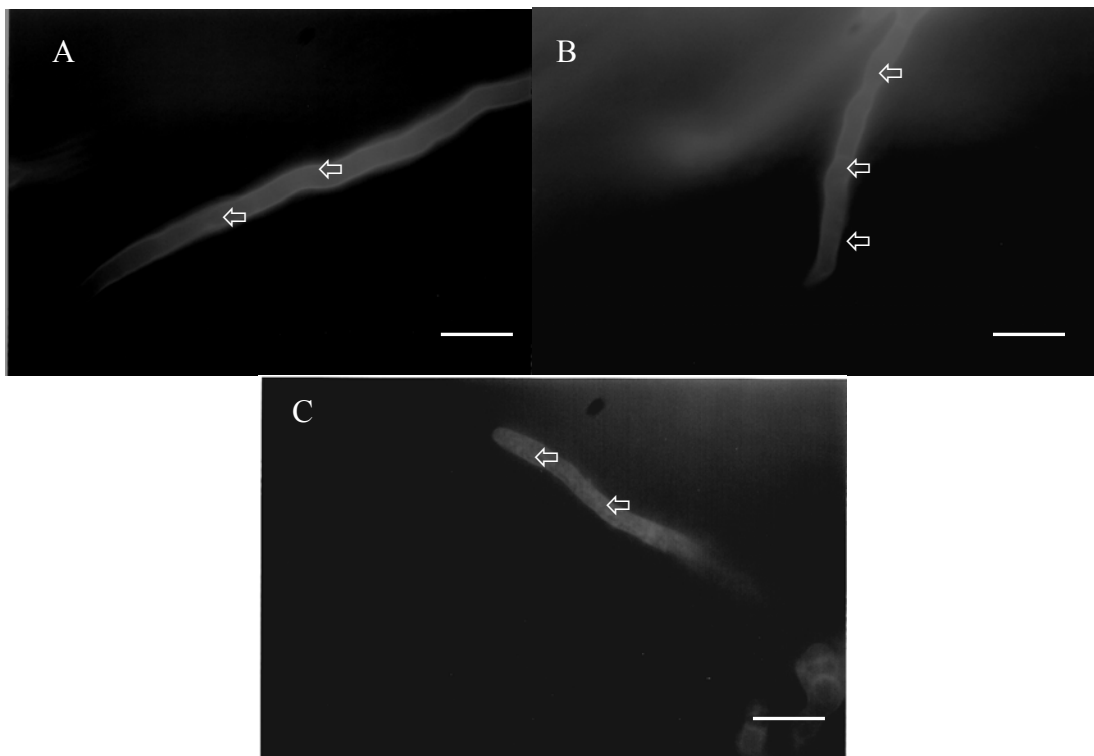


Figura 3. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* submetidas ao cultivo em presença de 11,24mg/L de cádmio, e tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos e filamentos em diferentes áreas das hifas (↔). Barra 10 μ m.

Por outro lado, amostras tratadas com 22,10 mg/L de cádmio exibem marcação fluorescente sob a forma de poucos e pequenos grumos no citoplasma. Intensa marcação amorfa fluorescente ao longo da hifa é visualizada. Alguns filamentos são também observados (figura 4A-D).

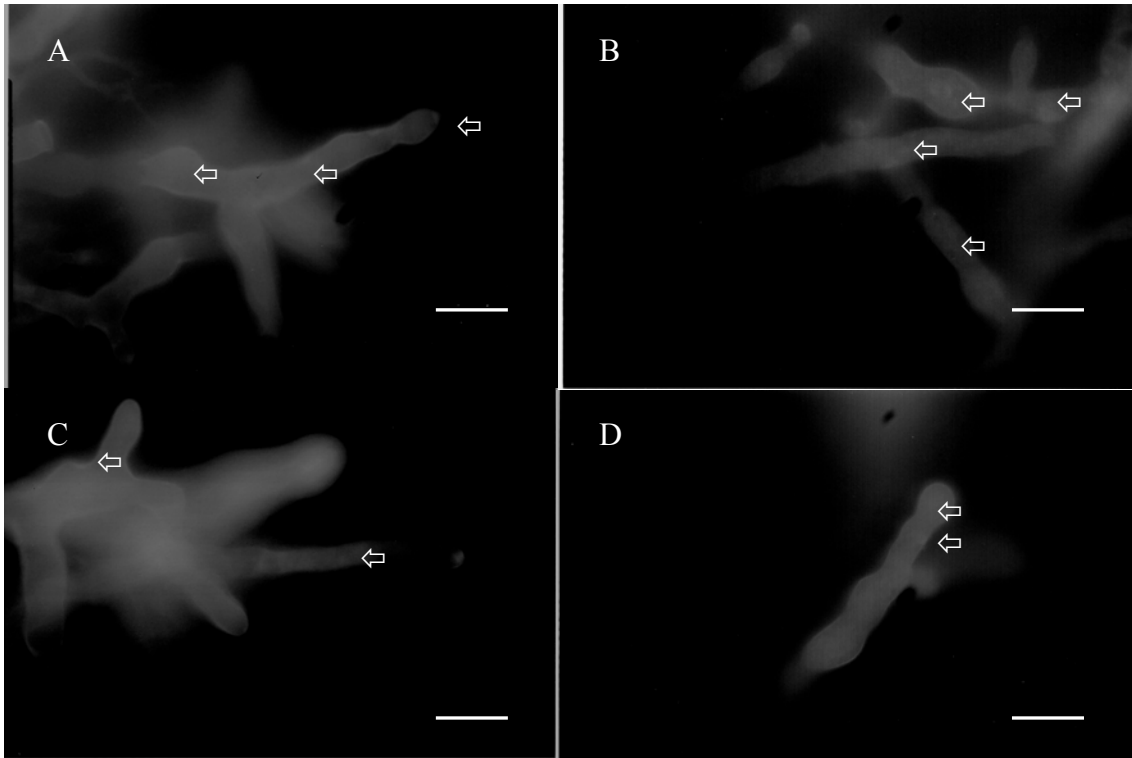


Figura 4. Microscopia de Fluorescência de amostras de *Cunninghamella elegans* submetidas ao cultivo em presença de 22,10mg/L de cádmio, e tratadas com FITC-faloidina. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina: grumos, filamentos, placas e “caps” em diferentes áreas das hifas (\leftrightarrow). Barra 10 μ m.

O estudo ultraestrutural foi realizado para verificar os possíveis efeitos do cádmio sobre a estrutura fina de *C. elegans*, com uso da técnica de rotina. As amostras controle exibem citoplasma homogêneo e com poucos vacúolos. A parede celular apresenta-se delgada e eletrondensa (Figuras 5A-D).

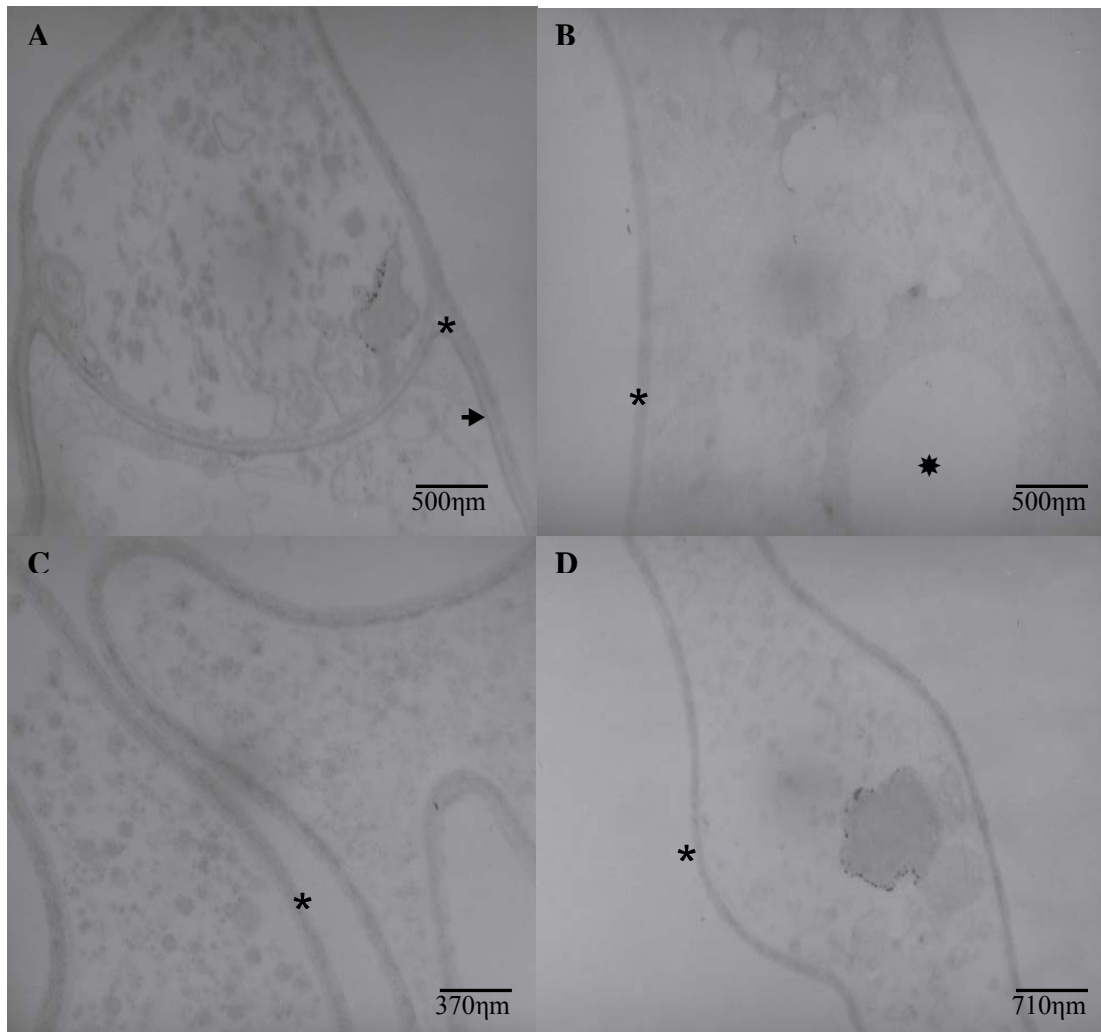


Figura 5. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans* controle, técnica de rotina. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (*).

Observa-se um aumento no número de grânulos no citoplasma das hifas expostas ao tratamento com 5,62mg/L de cádmio. Adicionalmente, intensa distribuição de granulação eletrondensa é observada em todo o citoplasma ao redor de vacúolos, bem como na região da membrana citoplasmática. Nota-se que o citoplasma se apresenta intensamente vacuolizado (Figura 6A-C).

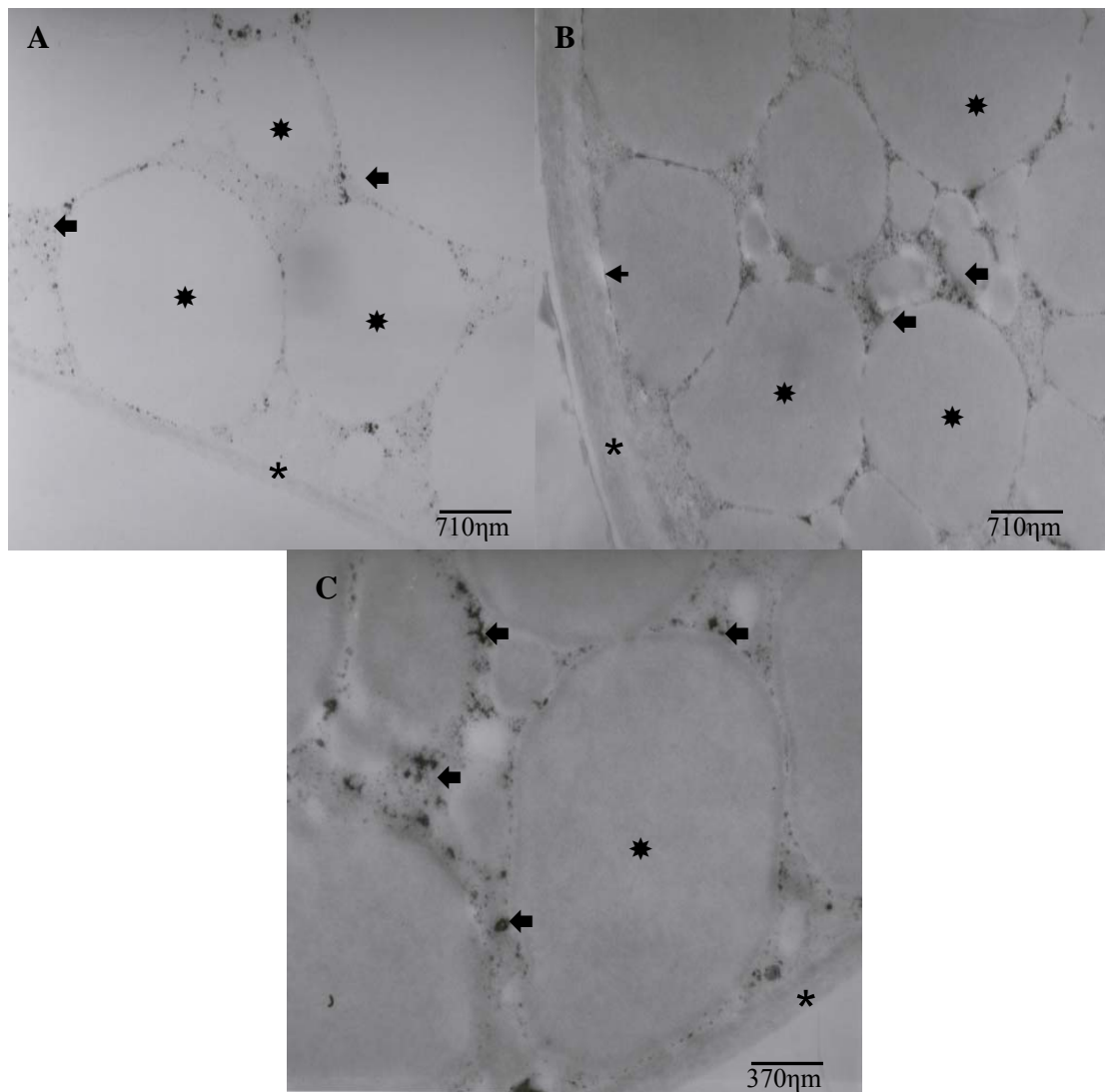


Figura 6. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans* cultivada em 5,62mg/L de cádmio, técnica de rotina. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (→); Vacúolos (★); Grânulos (➡).

Células submetidas ao cultivo em presença de 11,24mg/L de cádmio exibem parede celular com maior eletrondensidade e inúmeros grânulos são observados nas suas diferentes camadas, bem como na região da membrana citoplasmática. O citoplasma apresenta-se vacuolizado e extremamente heterogêneo (Figura 7A-B).

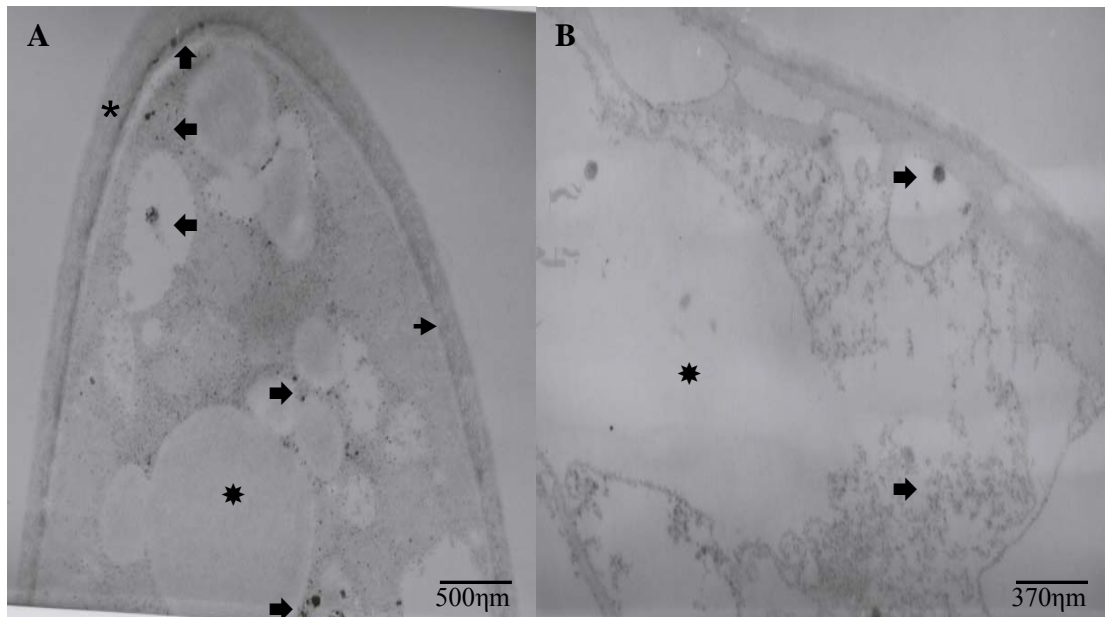


Figura 7. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultivada em 11,24 mg/L de cádmio, técnica de rotina. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (→); Vacúolos (*); Grânulos (▸).

Amostras tratadas com 22,10mg/L de cádmio apresentam citoplasma altamente heterogêneo e irregularmente granular. Pontos eletrondensos são visualizados na membrana citoplasmática e na parede celular (Figura 8A-C).

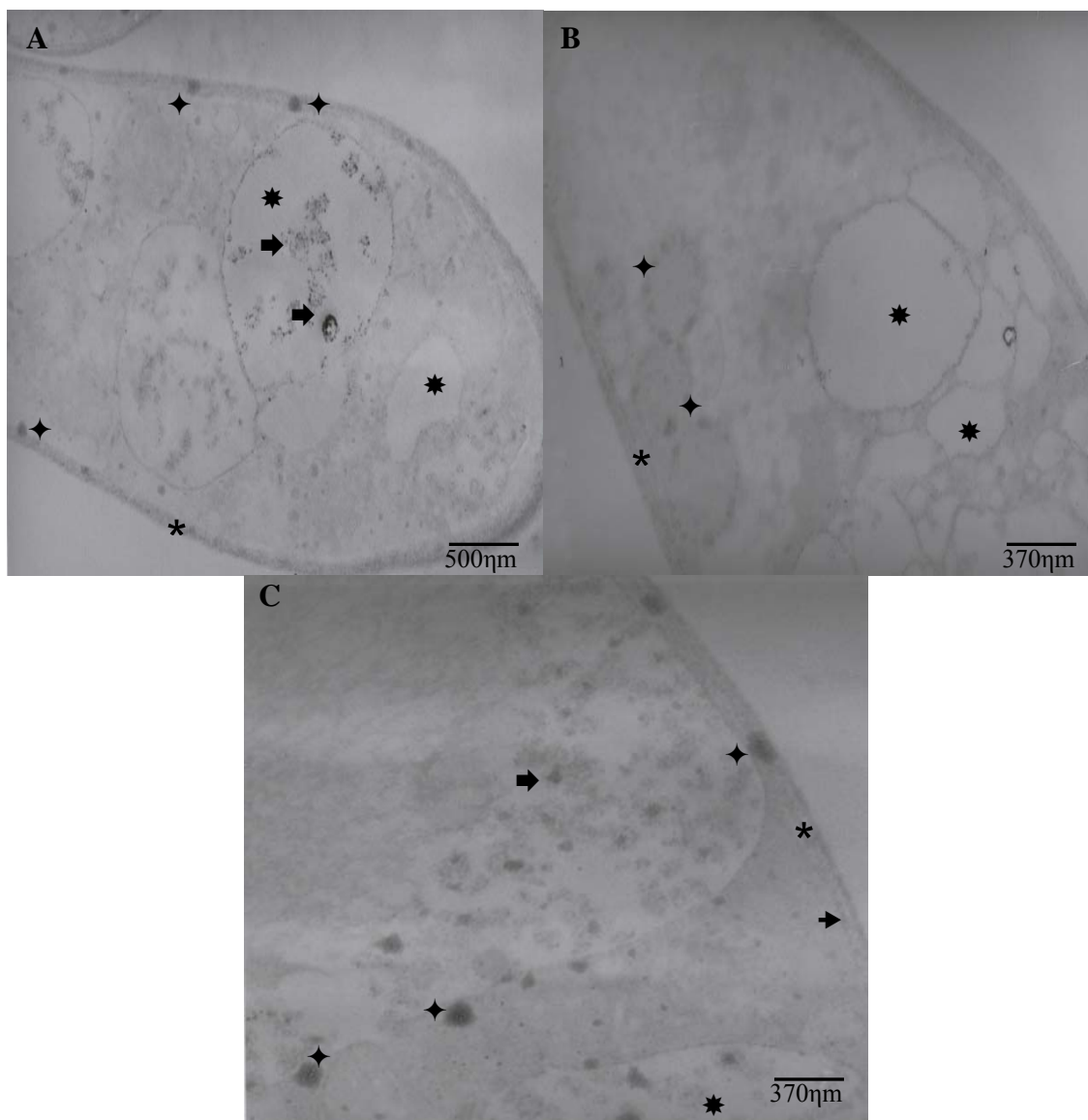


Figura 8. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultivada em 22,10 mg/L de cádmio, técnica de rotina. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (→); Vacúolos (★); Grânulos (➡); Corpos Eletrondensos (◆).

Uma análise citoquímica utilizando o vermelho de rutênio foi realizada para verificar o efeito do cádmio sobre a composição de carboidratos ácidos da superfície celular, bem como para identificar possíveis efeitos do metal na permeabilidade da membrana citoplasmática. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 9 -12.

A figura 9A-C exibe hifas de culturas controle. O uso do marcador permite observar a presença de produtos de reação citoquímica na superfície externa da parede celular. Tal marcação apresenta-se sob a forma de grânulos isolados e eletrondensos, bem como sob a forma de um delgado depósito distribuído de forma irregular na superfície das hifas. Adicionalmente, produtos de reação são observados na face interna da membrana citoplasmática.

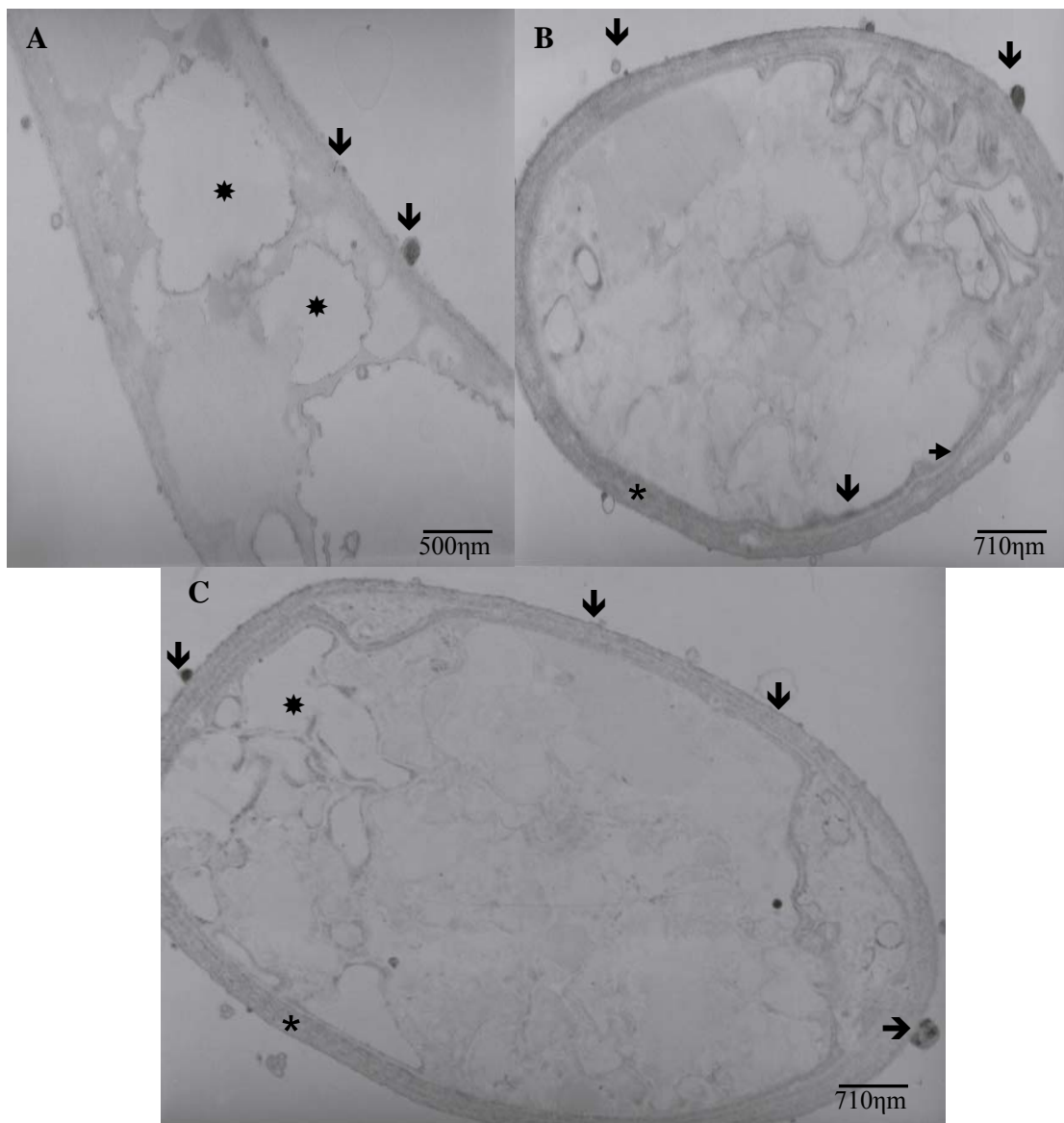


Figura 9. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura controle, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (*); Produtos de Reação (↑).

Hifas cultivadas em presença de 5,62mg/L de cádmio apresentam superfície celular intensamente marcada. Nota-se que todas as camadas da parede celular exibem produtos de reação homogeneamente distribuídos. Tais produtos apresentam-se como fibrilas e grânulos. Intensa marcação também é visualizada na região da membrana citoplasmática. Produtos de reação são visualizados na face citoplasmática da membrana e dispersos no citoplasma (Figura 10A-B).

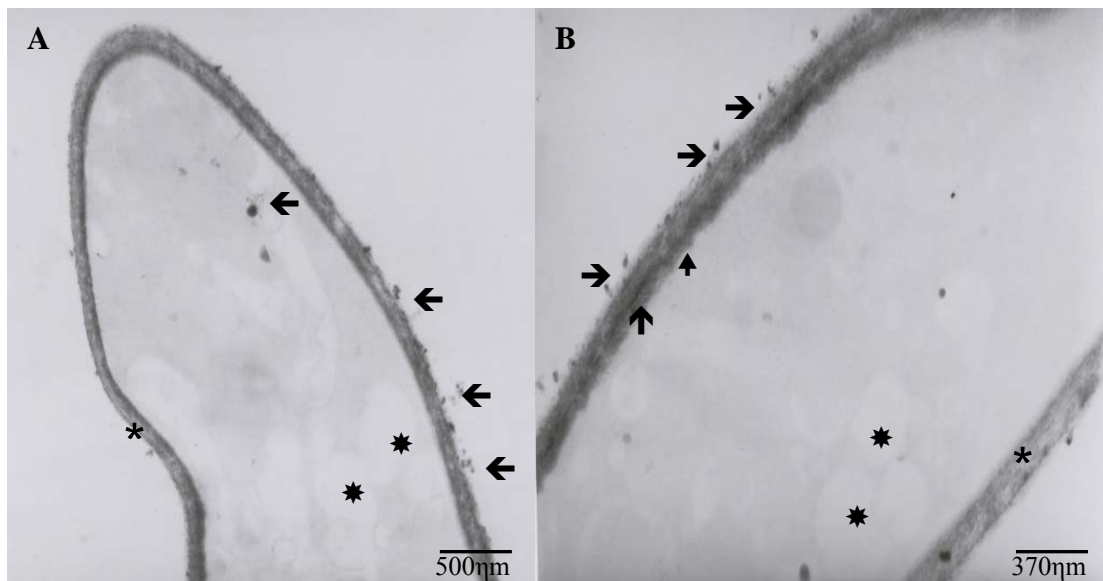


Figura 10. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura tratada com 5,62 mg/L de cádmio, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Produtos de Reação (⬆).

O tratamento das hifas com 11,24mg/L de cádmio resultou em uma redução da intensidade de marcação na superfície da parede celular. Inúmeras estruturas membranosas no citoplasma apresentam depósitos de alta densidade eletrônica. Intensa marcação é observada na região do citoplasma abaixo da membrana. Grandes inclusões de alta eletrondensidade, próximos a membrana citoplasmática, são também

visualizados. Pequenas granulações eletrondensas são observadas distribuídas pelo citoplasma (Figura 11A–D).

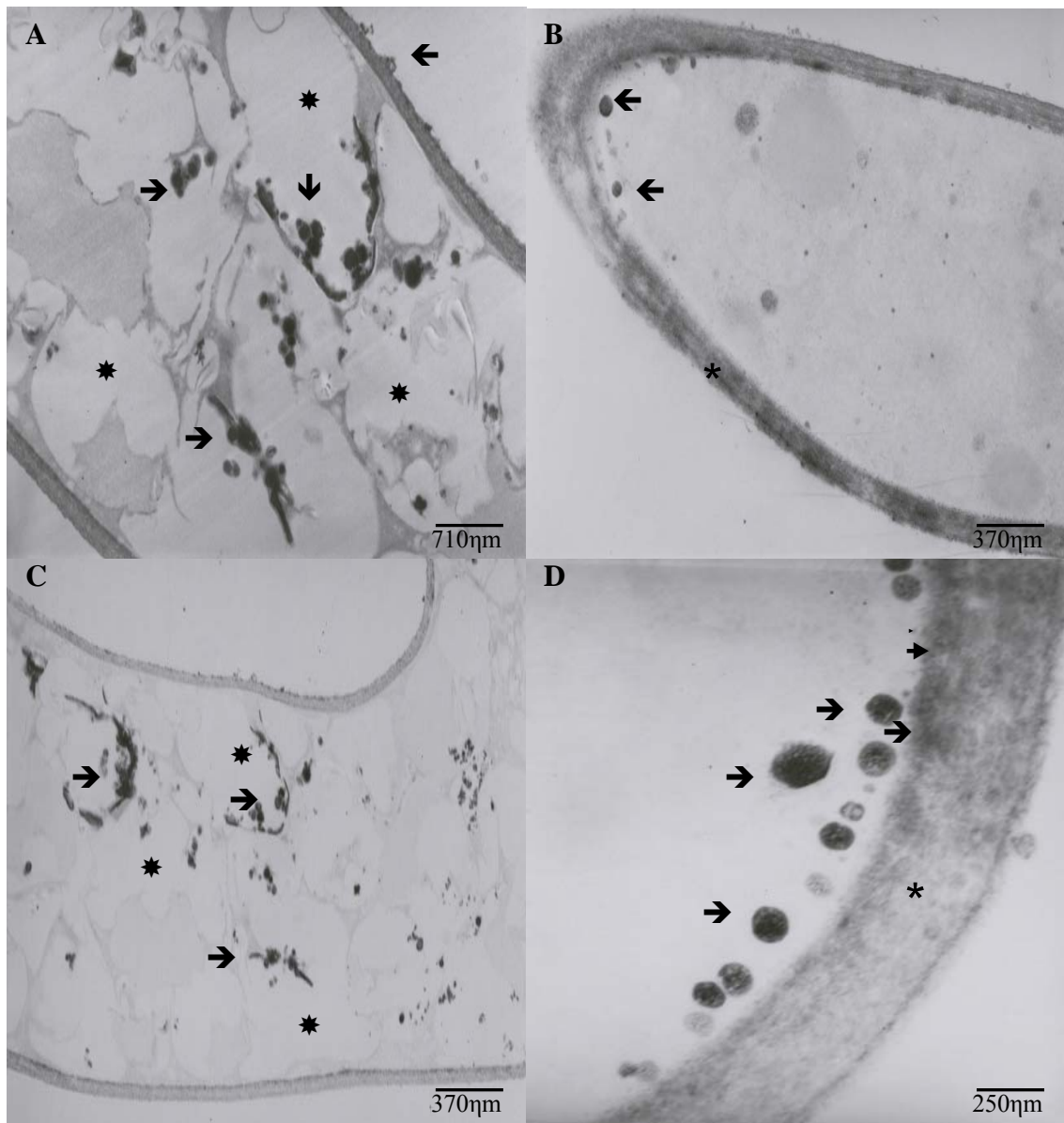


Figura 11. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura tratada com 11,24mg/L de cádmio, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (→); Vacúolos (*); Produtos de Reação (↑).

A figura 12A-D apresenta células expostas a 22,10mg/L de cádmio. Nota-se intensa deposição de produtos de reação na membrana celular. Na parede celular uma

fina deposição regularmente distribuída é percebida. Grânulos de alta densidade eletrônica são notados por todo o citoplasma.

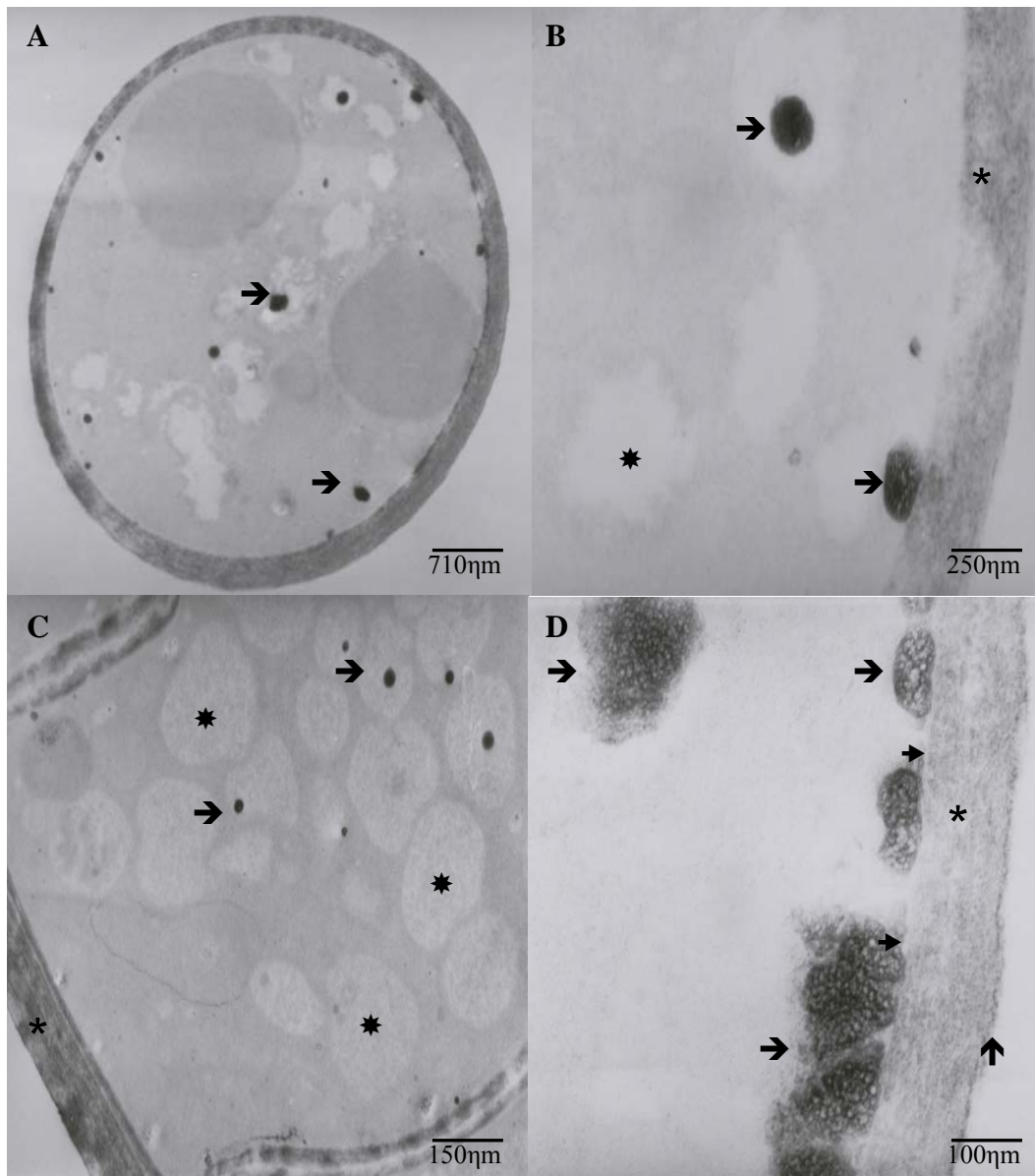


Figura 12. Eletromicrografias de amostras de *Cunninghamella elegans*, cultura tratada com 22,10mg/L de cádmio, técnica citoquímica com vermelho de rutênio. Parede Celular (*); Membrana Citoplasmática (➔); Vacúolos (★); Produtos de Reação (⬆).

Pode-se, dessa forma verificar que o cultivo em presença de cádmio induziu alterações no comportamento do citoesqueleto de actina, bem como na composição de

carboidratos ácidos da parede celular e na permeabilidade da membrana citoplasmática das células expostas. Tais variações, sem dúvida, estão diretamente associadas à concentração do metal utilizado.

DISCUSSÃO

A sobrevivência em um ambiente contaminado com metais pesados, ao longo do tempo, induziu nos microrganismos a habilidade de crescimento, a qual pode resultar de mecanismos intrínsecos ou induzidos (resistência/tolerância). Dessa forma, estudos que culminem com o entendimento do comportamento desses organismos em presença de metais são fundamentais para propósitos de remediação (Gadd, 1993; Nies, 1999).

A ligação de metais a superfície celular, seqüestro via proteínas ou polipeptídeos, ou complexação em vacúolos poderia minimizar os efeitos tóxicos dos metais nas células, em função da diminuição de sua efetiva concentração intracelular (Gomes, 1998; Gadd, 1993; Hall, 2002). Contudo, esses mecanismos de tolerância são pouco entendidos.

Inúmeros estudos associados ao processo de sorção de metais por microrganismos revelam variações em relação às respostas nas habilidades de crescimento, tolerância, e resistência, que dependem diretamente do tipo de metal, de sua concentração e de espécie microbiana. Além do mais, o potencial de sorção é também avaliado em função da idade das células, da temperatura ambiente e dos mecanismos específicos de captação de metal pelas células. Paralelamente, alguns estudos demonstram que o contato com metais pesados induz alterações morfológicas em microrganismos, observadas essencialmente, como variações na permeabilidade das membranas e na habilidade de acumulação intracelular (Kapoor & Viraraghavan 1995;

Burgstaller, 1997; Gardea-Torresdey et al., 1997; Levyal et al., 1997; Blaudez et al., 2000).

O cádmio é um íon metálico divalente que exibe potente toxicidade para muitos tipos celulares e organismos (Bhattacharyya et al., 2000; Jarup, 2002). Nas células renais induz um rearranjo do citoesqueleto de actina em cultura de células e as estimula a contrair de forma irregular (L'Azou et al., 2002; Takahashi et al., 2004).

Os mecanismos comuns de toxicidade celular do cádmio verificados em eucariotos ocorrem através de danos oxidativos a macromoléculas importantes, tais como aumento na peroxidação de lipídeos e inibição de enzimas anti-oxidativas como superóxido dismutase e a glutathione redutase (Stohs & Bagchi, 1995; Bhattacharyya et al., 2000; Waisberg et al., 2003).

Fungos filamentos servem como organismos modelo para uma série de mecanismos e processos celulares. Entre estes, estudos acerca do crescimento e da morfogênese são fundamentais. O crescimento celular depende diretamente da expansão apical da hifa, que é um processo complexo, que envolve interações reguladas entre a síntese e a expansão da parede celular e membrana plasmática, diversos movimentos intracelulares e a regulação da turgência. O citoesqueleto é o principal agente regulador e integrador desses processos. Dentre os elementos do citoesqueleto, os filamentos de actina contribuem para a morfogênese, transporte e exocitose de vesículas para a parede celular, localização de proteínas de membrana, forma do ápice da hifa, secreção de enzimas e a marcação do posicionamento para expansão apical. Dessa forma, modificações nesse componente do citoesqueleto poderiam culminar com modificações nas taxas de crescimento e na morfologia micelial (Shari'a et al., 1999; Bartnicki-Garcia et al., 2000; Heath et al., 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o cultivo em presença de cádmio resultou em variações de forma, arranjo e distribuição de actina nas hifas, como observado através da marcação com a faloidina-FITC. Sendo assim, demonstra-se, pela primeira vez o citoesqueleto de actina de *C. elegans*.

A dinâmica da polimerização e tipos de actina é essencial para a polarização celular e morfogênese (Wendland, 2001). A polarização do citoesqueleto de actina no ápice das hifas é requerida para seu crescimento, o que significa que qualquer alteração na dinâmica de polimerização entre as diferentes formas da actina resultaria em diferentes formas de expansão apical e, portanto alterações no crescimento (Wendland, 2001). A polarização resultaria no agrupamento da actina cortical sob a forma de placas na região do ápice da hifa, no processo de secreção de novos polímeros para a região e, sua consequente expansão (Momany, 2002).

Os resultados apresentados demonstraram que os arranjos de actina e sua distribuição são dependentes da concentração de cádmio, e que quanto maior a concentração de cádmio, hifas mais curtas, ramificadas e espessas são visualizadas. Tal dado sugere o motivo pelo qual o crescimento polarizado dos ápices das hifas é visivelmente reduzido nas amostras tratadas em relação ao controle. Paralelamente, as formas de apresentação do citoesqueleto de actina também foram modificadas pelo cultivo em presença do metal, indicando que a dinâmica de polimerização da actina é essencial para a expansão das hifas.

Por outro lado, embora poucos sejam os estudos com fungos, dados sobre o comportamento da morfologia celular em função da presença de metais pesados são relatados. Por exemplo, a presença de cobre em meio de cultura induziu alterações morfológicas em *Mucor rouxii*. A ligação do metal via mecanismo passivo, permite a observação do surgimento de grupos químicos funcionais na superfície celular, o que

conduz a uma alta habilidade de ligação e conseqüentemente a variações na morfologia celular, gerando micélios altamente ramificados e encurtados (Gardea-Torresdey et al., 1997).

Uma extensa ramificação nas hifas de *C. elegans* foi observada quando do cultivo em presença de cádmio. Contudo, tal processo de modificação na morfologia micelial é relativa a concentração do íon metálico e foi visualizado nas amostras submetidas a microscopia de fluorescência.

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

Alguns efeitos do cádmio sobre a estrutura celular são conhecidos. Alterações associadas à intensa vacuolização, atividade enzimática, condensação do citoplasma, aumento da eletrondensidade da matriz citosólica, redução de cristas mitocondriais, plasmólise e condensação da matriz cromatínica são citadas (Park e Lees, 2004; Pawert et al., 1996; Nishikawa, 2003).

O emprego do método de rotina para microscopia eletrônica de transmissão permitiu detectar variações na estrutura fina de *C. elegans* em função do cultivo em presença de diferentes concentrações de cádmio. Variações relativas a eletrondensidade, estrutura do citoplasma, vacuolização e comportamento da superfície celular foram visualizadas neste estudo, corroborando os dados da literatura e, demonstrando pela primeira vez tal comportamento nesta espécie.

A acumulação intracelular de metais está intimamente associada com parede celular e vacúolos, porém outras organelas e estruturas celulares também podem ser envolvidas (Blackwell, 1995). No presente estudo foi observado que durante cultivo na presença de concentrações crescentes de cádmio, as hifas exibiram muitos corpos

eletrondensos, além de intensa granulação no citoplasma, no interior de vacúolos, associados à parede celular e membrana citoplasmática.

Nishikawa et al., (2003), demonstraram a presença de depósitos de cádmio na membrana citoplasmática e principalmente em vacúolos da microalga *Clamydomonas acidophila*. Além disso, Cunningham et al. (1993), observaram que *Clostridium thermoaceticum* apresentou grande quantidade de precipitado eletrondenso durante crescimento na presença de cádmio, e propuseram ser este um mecanismo utilizado para mediar a resistência ao metal. Neste sentido, Aiking et al. 1984, também observaram o surgimento de muitas partículas eletrondensas no citoplasma de *Klebsiella aerogenes* durante seu crescimento na presença do cádmio.

Sendo assim, pode-se inferir que as granulações encontradas em diferentes regiões celulares de *C. elegans* sejam devido à precipitação de cádmio. Todavia, é necessário determinar a composição química desses grânulos para demonstrar que *C. elegans* é capaz de utilizar a precipitação como mecanismo de tolerância ao cádmio.

Sabe-se que a quantidade de cádmio ligada à superfície celular pode representar uma substancial fração do metal que é acumulado pelo micélio e pode ser parte dos mecanismos pelos quais os fungos podem tolerar os metais. Foi demonstrado que modificações químicas nas paredes celulares isoladas podem modificar a habilidade de acumulação de íons metálicos (Kappor e Viraraghavan, 1995). O bloqueio de grupamentos amino, carboxílicos ou hidroxílicos reduzem a quantidade de íons acumulados, indicando que os mesmos exibem papel essencial na ligação de metal (Brady e Duncan, 1994). Adicionalmente, o cádmio foi encontrado ligado a sítios negativamente carregados associados com componentes da parede celular como quitina, celulose e melanina (Galli et al., 1994; Turnau et al. 1994). Sem dúvida, os polímeros de superfície são essenciais na habilidade de captação de metais do meio. Contudo, a

maioria dos estudos está relacionada aos polímeros extraídos das células e não aos mesmos nas células vivas.

Estudo bioquímico das variações na distribuição subcelular de cádmio em fungo demonstram que o metal localiza-se na parede celular, no citoplasma e em vacúolos (Blaudez et al., 2000).

Em leveduras, a toxicidade e a acumulação de cádmio estão relacionadas à produção de glicoproteínas extracelulares. Foi demonstrado que durante o período de adaptação dos organismos a presença do metal ocorre uma variação na composição de polímeros de superfície celular através de análises bioquímicas e por espectrometria.

A habilidade de resistência/tolerância e acumulação de metais está associada a composição sacarídica dos exopolímeros da parede celular que determinam a forma de sorção e captação, e que gera adaptação dos organismos a presença de altas concentrações de metais (Bartinicki-Garcia et al., 2000).

O vermelho de rutênio corresponde a um complexo catiônico positivamente carregado, e que foi introduzido nos protocolos de microscopia eletrônica por Luft (1964). O marcador apresenta habilidade de produzir excelente definição e localização de polissacarídeos em células vegetais e animais. Adicionalmente, por ser excluído do citoplasma em presença de membrana íntegra, o composto tem sido aplicado em ensaios para avaliar possíveis alterações de permeabilidade e fluidez. Neste estudo, a utilização do vermelho de rutênio foi realizada com o intuito de verificar uma possível alteração na permeabilidade, bem como variações no perfil de polímeros da parede celular de hifas submetidas ao tratamento com cádmio. Uma busca na literatura revela poucos trabalhos com a citoquímica para vermelho de rutênio em fungos.

Variações na composição, distribuição e quantidade de polímeros de paredes celulares de fungos são comuns (Bartinicki-Garcia, 1968). Carboidratos nas superfícies

de parede celular de fungos, com o emprego de técnicas citoquímicas aplicando-se, especialmente, lectinas como marcadores, são relatados (Souza, 1989).

Os dados obtidos no estudo ultraestrutural revelam variações na marcação citoquímica de polímeros de superfície, sugerindo que o cultivo em presença de cádmio induz alterações na expressão/composição de polímeros da superfície celular de *C. elegans*. Ressalte-se que tal variação está diretamente relacionada a concentração do metal no meio de cultivo.

Considerando que nos resultados obtidos no presente trabalho produtos de reação citoquímica foram visualizados no citoplasma, pode-se sugerir que ocorre variação na permeabilidade das hifas.

Nascimento et al., (2000) analisaram os efeitos do Tween 80 sobre a ultraestrutura de *Candida lipolytica* e verificaram que o surfactante sintético induz variações na distribuição de polímeros da superfície celular. Ocorre variação no padrão de marcação da superfície celular como resposta a presença do surfactante.

Após sua entrada nas células, os íons metálicos são compartimentalizados, estrategicamente, em diferentes organelas subcelulares (vacúolos e mitocôndrias). No entanto, as estratégias são diferentes para metais essenciais e não-essenciais. Para os essenciais, limitações na internalização, ativa excreção e estocagem em forma inerte, ou excreção do metal estocado são comumente observadas. Por outro lado, para os não-essenciais a estocagem é uma alternativa fundamental, onde a concentração interna aumenta com a elevação da concentração no meio (Vivjer et al., 2004).

Estudos associados ao comportamento do citoesqueleto de actina e à citoquímica ultraestrutural em fungos são escassos. Dessa forma, análises mais sistematizadas devem ser realizadas para ampliar o conhecimento acerca das respostas ao nível celular

de sistemas para biorremediação. Dessa forma, o presente trabalho é o primeiro a relatar os efeitos do cádmio sobre a actina e estrutura fina de *Cunninghamella elegans*.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao CNPq, FINEP, PRONEX e a CAPES pelo suporte técnico e financeiro para desenvolvimento do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- Nascimento, A.E., Shari' a, A.E.N., Lima, M.A.B. and Campos-Takaki, G.M., 2000. Brazilian Journal of Microbiology 31, 30-36.
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E., Gierz, G., Lopez-Franco, R. and Lu, H., 2000. Mapping the growth of fungal Hyphal: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. Biophysical Journal 79(5), 2382-2390.
- Bhattacharyya, M. H., Wilson, A. K., Rajan, S. S., and Jonah, M., 2000. Biochemical pathways in cadmium toxicity. In Molecular Biology and Toxicology of Metals (R. K. Zalups, and J. Koropatnick, Editor) pp. 34-74. Taylor and Francis, London, U.K.
- Blackwell, K.J., Singleton, I. and Tobin, J.M., 1995. Metal cation uptake by yeast: a review. Applied microbiology and Biotechnology 43 (4), 579-584.
- Blaudez, D., Botton, B. and Chalot, M., 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiology 146, 1109-1117.

Brady, D. and Duncan, J.R., 1994. Bioaccumulation of metal-cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 149–54.

Burgstaller, W., 1997. Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Critical Reviews of Microbiology* 23, 1-46.

Cunningham, D.P. and Lundie Jr, L.L., 1993. Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1), 7-14.

De Souza, W., 2000. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia - Rio de Janeiro, p.271.

Deckert, J., 2005. Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals* 18(5), 475-481.

Gadd, G. M., 1993. Tansley review no. 47: interactions of fungi with toxic metals. *New Phytology* 124, 25-60.

Galli, U., Schuepp, H. and Brunold, C., 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiology of Plants* 92, 364-368.

Gardea-Torresdey, J. L., Cano-Aguilera, I., Webb, R. and Gutiérrez-Corona, F., 1997. Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 435-441.

Gavrillesca M., 2004. Removal of heavy metals from the environmental by biosorption. *Engineering and Life Science* 4, 219–32.

Gomes, N.C.M., Mendonça-Hagler, L.C.S. and Savaidis, I., 1998. Metal Biorremediation by Microorganisms. *Revista de Microbiologia* 29, 85-92.

Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal Experimental of Botany* 53, 1-11.

Heath, I.B., Gupta, G. and Bai, S., 2000. Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 30, 45-62.

Hesseltine, C.W. and Anderson, R.F., 1957. Microbiological Production of Carotenóides I. Zygosporé and Carotene produced by Intraspecific and crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. *Mycology* 49, 449-452.

Jarup, L., 2002. Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17(2), 35-39.

Kapoor, A. and Viraraghavan, T., 1995. Fungi biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 53, 195–206.

Kratochvil, D. and Volesky, B., 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnology* 16(7), 291–300.

Kumar, G.P. and Prasad, M.N., 2004. Cadmium toxicity to *Ceratophyllum demersum*: morphological symptoms, membrane damage, and ion leakage. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72(5), 1038-1045.

L'Azou, B., Dubus, I., Ohayon-Courtès, C., Labouyrie, J. P., Perez, L., Pouvreau, C., Juvet, L., and Cambar, J., 2002. Cadmium induces direct morphological changes in mesangial cell culture. *Toxicology* 179, 233-245.

Leyval, C., Turnau, K. and Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.

Luft, J. H., 1971. Ruthenium red and violet II: Fine Structural Localization in Animal Tissues. *Anatomy Research* 171, 369-416.

Momany, M., 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion of Microbiology* 5, 580-585.

Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I. and Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiological Ecology* 44, 253-259.

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

Park, E.K. and Lees, E.M., 2004. The interaction of endosulfan with Collembolan, *Proisotoma minuta* (Tullberg): Toxicity, the effects of sub-lethal concentrations and metabolism. *Pest Management Science* 60, 710-718.

Pawert, M., Triebckorn, R., Graff, S., Berkus, M., Schultz, J. and Kohler, H.R., 1996. Cellular alterations in collembolan midgut as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *The Science of the Total Environment* 180, 187-200.

Rosen, B.P., 2002. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133 (3), 689-693.

Souza, W., 1989. Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. Vol. II Citoquímica ultraestrutural. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica - Rio de Janeiro.

Shari' a, A. E. N., Nascimento, A. E. and Campos-Takaki, G. M., 1999. Actin Cytoskeleton Structure and its localization in *Gongronella butleri*, *Mucor javanicus* and *Absidia cylindrospora* (Mucorales-Zygomycetes). *Boletim Micológico* 14, 1-7.

Stohs, S. J. and Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321-336.

Takahashi, Y., Poteser, M., Masui, H., Koizumi, N. and Wakabayashi, I., 2004. Effects of Cadmium in Vitro on Contractile and Relaxant Responses of Isolated Rat Aortas. *Environmental Health and Preventive Medicine* 9, 251–256.

Templeton, D. M., 2000. Metal ions and the cytoskeleton. In *Molecular Biology and Toxicology of Metals* (R. F. Zalups, and J. Loropatnick, Editor), pp. 460-476. Taylor and Francis, London.

Turnau, K., Kottke, I., Dexheimer, J. and Botton, B., 1994. Element distribution of *Pisolithus arrhizus* treated with cadmium. *Annals of Botany* 74, 137-142.

Vijver, M.G., Gestel, C.A.M.V., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M. and Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.

Volesky, B. and Holan, Z. R., 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* 11, 235-250.

Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. E. and Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192, 95-117.

Wang, B.J. and Yang, H.F., 1996. Interaction of microorganisms with heavy metals. *Environments Science* 18, 35-9.

Wendland, J., 2001. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genetics and Biology* 34, 63-82.

Zalizniak, L. and Nugegoda, D., 2006. Cadmium Toxicity to *Daphnia carinata*. *Bulletin of Environments Contamination and Toxicology* 77(5), 748-754.

SEGUNDO ARTIGO

ACUMULAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE POLIFOSFATO POR *Cunninghamella elegans* EM RESPOSTA AO CÁDMIO

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Microbiology.

ACUMULAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE POLIFOSFATO POR
***Cunninghamella elegans* EM RESPOSTA AO CÁDMIO**

Marcos Antonio Barbosa de Lima^{1,2}, Patrícia Mendes de Souza^{1,2}
Aline Elesbão do Nascimento¹, Galba Maria de Campos Takaki^{1,2}

1. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, PE, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos - Departamento de Micologia Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Recentemente tem sido postulado que o polifosfato pode participar na tolerância de algumas bactérias e algas a metais pesados. Para avaliar esta possibilidade em *Cunninghamella elegans*, microrganismo capaz de acumular grande quantidade de fósforo na forma de polifosfato, este fungo foi cultivado na presença de concentrações crescentes de cádmio. *C. elegans* foi capaz de crescer no meio contendo concentrações de cádmio de 5,62mg/L, 11,24mg/L 22,10mg/L. Nestas condições *C. elegans* consumiu, respectivamente 18%, 18% e 15% a mais de fósforo e produziu quantidade de biomassa aproximadamente igual às células que cresceram na ausência do cádmio. Por outro lado, foram constatadas alterações das frações do polifosfato em função do tempo de cultivo e concentração inicial de cádmio. A fração ácido-insolúvel do polifosfato exibiu maior grau de variação de seu conteúdo em resposta ao aumento do metal no meio de cultivo. A importância das distintas frações de polifosfato na capacidade de tolerância de *C. elegans* ao cádmio é discutida.

Palavras-chave: *Cunninghamella elegans*, Polifosfato, Acumulação, Cádmio, Tolerância

INTRODUÇÃO

O Polifosfato (PoliPi) 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) e pode conter de três a mais de mil resíduos de fosfato (1).

A maioria dos microrganismos estudados, incluindo bactérias, cianobactérias, fungos, protozoários e algas acumulam polifosfato, o qual pode atingir 10-20% do peso seco da célula (1,2). A ubiquidade deste polímero, a sua produção em quantidades que excedem os requerimentos de fosfato fisiológico, bem como a necessidade de grande investimento de energia metabólica para sua produção, sugere que o polifosfato tem funções específicas e fundamentais à vida (3-4).

O metabolismo do PoliPi em microrganismos oscila muito em função das condições ambientais resultando em uma variação dinâmica de concentração de 100 a mais de 1000 vezes. Esta marcante variabilidade de conteúdo conseqüentemente afeta muitas funções celulares (5-6).

O processo de extração com vários reagentes pode dividir o polifosfato em distintas frações, as quais diferem em localização celular e peso molecular (1,2). A diferença de localização pode resultar em funções distintas (7). Estudos têm demonstrado que o conteúdo e o comprimento das cadeias das diferentes frações do PoliPi depende da fase de crescimento (8), assim como das condições de cultivo (9, 10).

Muitas funções biológicas para o PoliPi têm sido sugeridas ou demonstradas, como: tampão para álcalis, quelante de metais, controle da expressão gênica, bomba de fosfato, regulador para respostas celulares ao estresse e para sobrevivência na fase estacionária de crescimento (3-7). Recentemente, o PoliPi tem associado a tolerância de microrganismos a metais pesados tóxicos.

Cunninghamella elegans espécie reconhecida devido a sua capacidade de degradar xenobióticos recalcitrantes danosos ao meio ambiente. Além do mais, Lima et. al. (9) demonstraram que *C. elegans* pode acumular grande quantidade de polifosfato.

Sendo assim, o presente trabalho, tem como objetivo investigar a tolerância de *C. elegans* ao cádmio e o possível envolvimento do metabolismo do polifosfato neste processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Métodos Microbiológicos

Microrganismo e condições de cultivo: *Cunninghamella elegans* IFM 46109 gentilmente cedida pela coleção de culturas do Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University/Japan foi mantida em BDA (Batata Dextrose Agar) a 5°C e transferida para o mesmo meio em intervalos de seis meses. O meio BDA também foi usado para esporulação a 28°C, durante 5 dias. Uma Suspensão de esporos com concentração de 10^5 células/mL foi preparada e transferida para frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 50 mL de Meio Sintético para Mucorales (SMM) descrito por Hesseltine and Anderson (11) acrescido de solução de cloreto de cádmio nas concentrações de 5,62mg/L; 11,24mg/L e 22,10mg/L. Culturas controle foram crescidas no meio original sem a presença de cádmio. Os frascos foram incubados durante 15 dias, a 28°C, sob agitação orbital de 250 rpm. Todos os experimentos foram realizados usando três réplicas.

Curvas de crescimento: A biomassa coletada nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de crescimento foram submetidas a liofilização e mantidas em dessecador a vácuo até peso constante. O valor final obtido correspondeu a média aritmética de três réplicas de cada amostras.

Métodos Analíticos

Determinação de fósforo: Aliquotas do sobrenadante de cultura foram coletadas nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de crescimento. O consumo de fosfato foi determinado segundo o método de Fiske e Subbaro (12). Uma curva padrão foi construída usando solução de fosfato de potássio (0.5 to 5.0 g/L). O valor final correspondeu a média aritmética de três réplicas.

Extração das frações de polifosfato: A extração seqüencial do polifosfato foi realizada de acordo com o método descrito por Smirnov et al. (13). Uma quantidade padronizada de biomassa seca (100mg) foi tratada inicialmente com 3mL de ácido perclórico 0,5N a 0°C por 30 minutos. O extrato resultante foi centrifugado a 12.000g a temperatura de 0°C por 5 minutos. O sobrenadante correspondeu a fração ácido-solúvel do PoliPi. O resíduo foi ressuspensão em hidróxido de sódio 0.05 N, pH 12, a 0°C por 30 minutos e a fração álcali-solúvel do PoliPi foi obtida depois da centrifugação a 12.000g, sob a temperatura de 0°C por 5 minutos. O resíduo remanescente foi novamente tratado com ácido perclórico 0,5 N por 30 minutos, a 90°C e a fração ácido-insolúvel do polifosfato foi obtida por centrifugação a 12.000g, por 5 minutos, a temperatura de 27°C. O conteúdo de ortofosfato e fósforo lábil foram determinados nas frações ácido-solúvel e álcali-solúvel. A quantidade de fósforo lábil, considerada polifosfato, foi determinada pela diferença do conteúdo do ortofosfato (Pi) antes e após a hidrólise em HCl a 100°C por 45 minutos de acordo com o método de Macgrath e Quinn (14). O fosfato liberado foi determinado pelo método de Fiske e Subbarow (12). O polifosfato total corresponde a soma das três frações obtidas.

RESULTADOS

Na figura 1 observa-se os efeitos de diferentes concentrações de cádmio no crescimento de *C. elegans*.

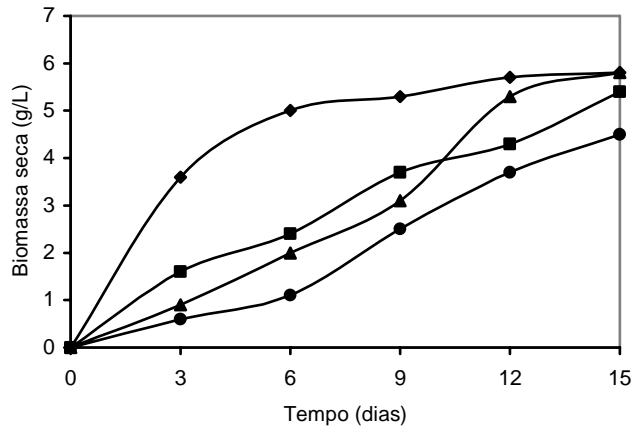


Figura 1. Crescimento de *C. elegans* na presença de cádmio. Amostras controle (◆) e tratadas com cádmio nas concentrações 5,62mg/L (■), 11,24mg/L (▲) e 22,10mg/L (●).

A curva de crescimento controle exibiu fase exponencial até o terceiro dia e estacionária do sexto ao décimo quinto dia de incubação. Por outro lado, as culturas submetidas ao tratamento com cádmio não apresentaram as fases típicas de crescimento, mas sim um crescimento ascendente, contínuo e linear durante todo o tempo de cultivo (figura 1). Todavia, pode-se observar que houve uma diminuição da taxa de crescimento proporcional a concentração inicial do metal e ao tempo de cultivo, quando o fungo é cultivado na presença de cádmio. Sendo assim, a redução mais drástica no crescimento ocorreu após 3 dias, na concentração inicial de 22,10mg/L de cádmio, correspondendo a 83% em comparação ao crescimento controle.

A partir do sexto dia de cultivo, a diferença de crescimento entre as culturas controle e tratadas com cádmio diminuíram progressivamente até o final do cultivo. Por

consequente, a produção final de biomassa foi 5,8g/L para amostras controle, 5,4g/L; 5,8g/L; e 4,5g/L; respectivamente para as concentrações de 5,62mg/L; 11,24mg/L e 22,10mg/L de cádmio. Dessa forma, as distintas concentrações de cádmio limitaram circunstancialmente o crescimento de *C. elegans*, porém não o inibiram.

Com relação as curvas de consumo de fósforo (figura 2), observou-se uma diminuição contínua ao longo do crescimento, tanto das culturas controle quanto das cultivadas com cádmio. Entretanto, até o terceiro dia de cultivo as culturas controle consumiram mais fósforo do que àquelas tratadas com todas as concentrações do metal. Por conseguinte, a partir do sexto dia de crescimento em diante o micélio de *C. elegans* cultivado com cádmio passou a consumir mais fósforo do que o grupo de células controle.

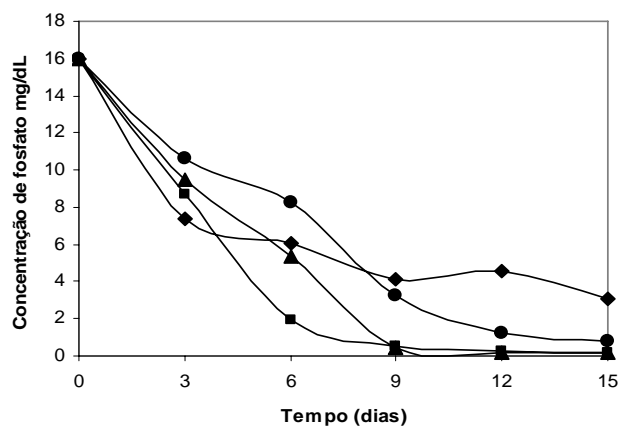


Figura 2. Consumo de fósforo inorgânico por *C. elegans* na presença de cádmio. Amostras controle (-♦-) e tratadas com cádmio nas concentrações 5,62mg/L (-■-), 11,24mg/L (-▲-) e 22,10mg/L (-★-).

Observou-se ainda que, no nono dia de crescimento as culturas crescidas nas concentrações de 5,62mg/L e 11,24mg/L de cádmio esgotaram quase que completamente o fósforo disponível no meio de cultura. Ao final do crescimento o consumo total de fósforo pelas culturas controle correspondeu a 80%, ao passo que, o

das culturas tratadas com cádmio nas concentrações de 5,62mg/L, 11,24mg/L e 22,10mg/L foi de 99%, 99% e 95%, respectivamente.

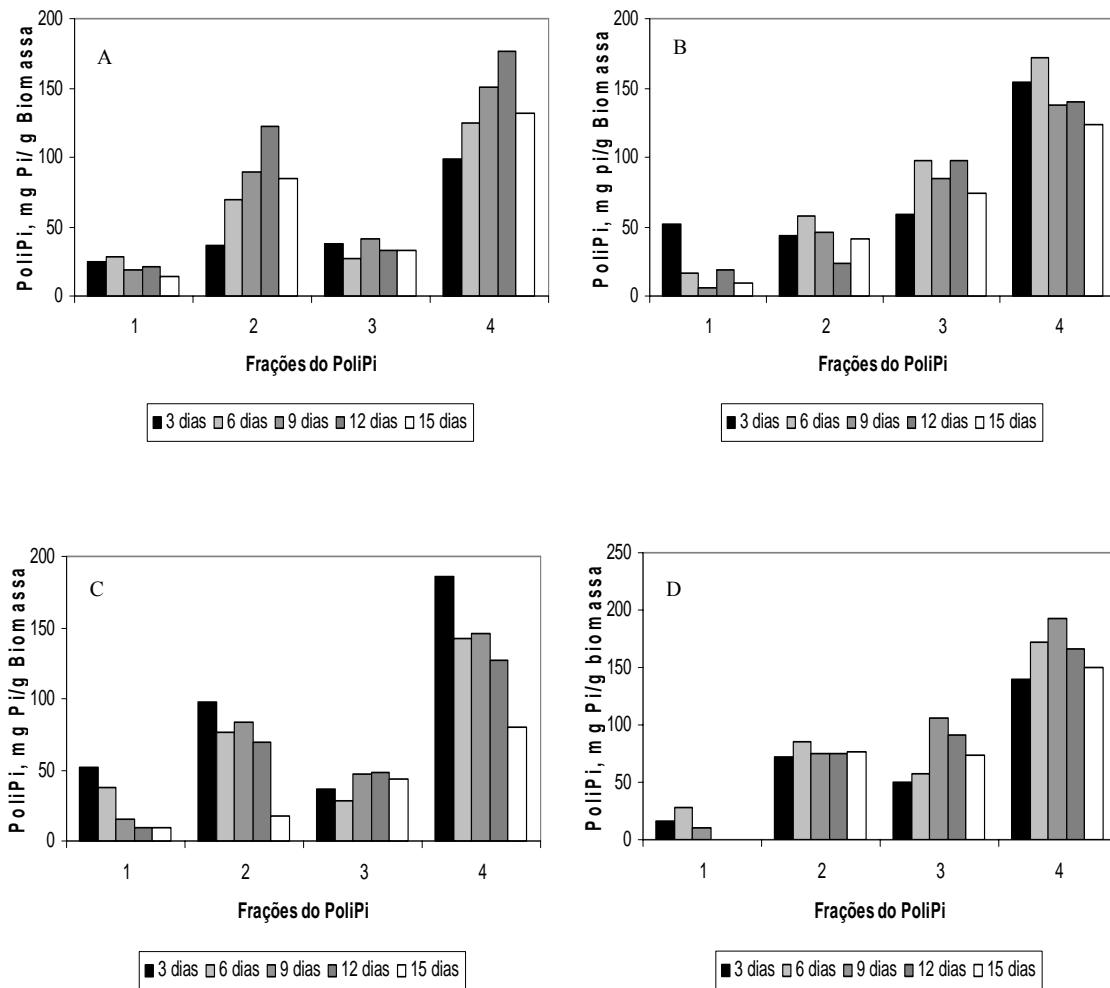


Figura 3. Frações do polifosfato durante crescimento de *C. elegans* em diferentes concentrações de cádmio. Amostras controle (A) e tratadas com cádmio nas concentrações 5,62mg/L (B), 11,24mg/L (C) e 22,10mg/L (D). Fração ácido-solúvel (1), Fração base-solúvel (2), Fração ácido-insolúvel (3), PolPi total (4).

Para verificar o efeito do cádmio no metabolismo do polifosfato, os níveis deste polímero foram determinados durante o crescimento de *C. elegans* em meio de cultivo sem e com cádmio em diferentes concentrações (Figura 3A-3D).

A figura 3A, apresenta o comportamento das frações do polifosfato durante crescimento de *C. elegans* na ausência de cádmio (culturas controle). Pode-se observar que a fração álcali-solúvel foi acumulada ao longo do crescimento atingindo um pico máximo de 122,5mgPi/g de biomassa. Em contraste, não ocorreram variações significativas das frações ácido-solúvel e ácido-insolúvel ao longo do crescimento. Portanto, está evidente a prevalência da fração álcali-solúvel, sendo a fração que mais contribuiu para o conteúdo do polifosfato total. Dessa forma o comportamento do polifosfato total é determinado pela fração álcali-solúvel.

Por outro lado, durante crescimento na presença de 5,62mg/L de cádmio (figura 3B), observou-se degradação da fração álcali-solúvel, cujo valor máximo foi 53% menor do que o obtido na ausência do metal. Nesta condição, destaca-se que os níveis da fração ácido-insolúvel aumentaram muito alcançando um pico de 97,3mg Pi/g de biomassa, ou seja 58% superior ao apresentado na ausência do cádmio. Ao mesmo tempo, a fração ácido-solúvel diminuiu ao longo do tempo, todavia continua a exibir valores inferiores aos das outras frações.

Com o aumento da concentração de cádmio para 11,24mg/L (figura 3C), a fração álcali-solúvel voltou a predominar, muito embora com pico máximo de 98mg Pi/g de biomassa, valor inferior ao exibido no controle. Entretanto, ao longo do tempo observou-se que a mesma foi continuamente degradada até o final do cultivo. Mais uma vez o comportamento da fração total foi influenciado pela fração álcali-solúvel. A fração ácido-insolúvel retornou aos níveis semelhantes das culturas controle durante todos os intervalos de crescimento. Paralelamente, a fração ácido-solúvel, da mesma forma que na condição anterior, diminuiu ao longo do tempo, todavia continua a exibir valores inferiores aos das outras frações.

Por fim, na concentração de cádmio de 22,10mg/L (figura 3D), não observou-se alteração significativa da concentração álcali-solúvel, quando comparado com a condição anterior, que praticamente não oscila durante todo o crescimento. Enquanto que, a fração ácido-insolúvel apresenta níveis praticamente iguais ao da fração álcali-solúvel considerando a concentração média do todo o crescimento, a fração ácido-solúvel não foi detectada nos intervalos de 12 e 15 dias de crescimento.

DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos do cádmio sobre os microrganismos são bem conhecidos e envolvem vários mecanismos, como ligação a biomoléculas (enzimas e ácido desoxirribonucléico - ADN) e indução de estresse oxidativo. Dessa maneira, os metais interferem com muitos processos fisiológicos diferentes de acordo com sua concentração. Estes efeitos resultam, principalmente, na diminuição das taxas de crescimento e/ou inibição total, assim como morte celular (15,16).

Entretanto, muitos microrganismos exibem a habilidade de crescer em altas concentrações de metal tóxico o que pode ser resultado de mecanismos intrínsecos ou induzidos, bem como, de fatores ambientais que podem reduzir a toxicidade do metal (17).

O cádmio alterou o padrão de crescimento normal da bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, de modo que não se observou as fases típicas de crescimento. Além disso, o cádmio foi inibitório uma vez que não se observou aumento de crescimento no meio com metal (18). Adicionalmente, o cádmio tem efeito limitante e inibitório para as características de crescimento de muitas espécies de fungos (19-21).

Os resultados deste estudo demonstram que *C. elegans* cresce continuamente na presença de diferentes concentrações de cádmio, produzindo ao final de 15 dias de cultivo 5,4g/L, 5,8g/L e 4,5g/L de biomassa, nas concentrações de cádmio de 5,62mg/L, 11,24mg/L e 22,10mg/L, respectivamente contra 5,8g/L do grupo controle. Portanto, *C. elegans* foi capaz de resistir ao cádmio até a concentração de 22.10mg/L, o que sugere o desenvolvimento de adaptação fisiológica ao metal.

Em adição, a produção de biomassa de *C. elegans* em presença de cádmio foi igual ou superior à produção da maioria dos fungos relatados por Massaccesi et al. (19), crescendo em concentração de 10mg/L de cádmio. Além disso, Souza et al. (22) revelam que *C. elegans* crescendo em meio contendo 2mM de cobre produziu 57,3% a mais de biomassa do que as culturas controle.

Os microrganismos empregam uma série de mecanismos diferentes para adaptação aos metais pesados (23). Aiking et al. (24), sugere que acumulação de fosfato por *Klebsiella aerogenes* é um mecanismo de detoxificação do cádmio.

Podemos observar nesta pesquisa que as culturas tratadas com cádmio, a partir do sexto dia de cultivo, período em que as curvas de crescimento começaram a apresentar forte ascensão, exibiram maior consumo de fósforo do que a culturas controle. Ao final do cultivo, as células cultivadas nas concentrações de 5,62mg/L, 11,24mg/L e 22,10mg/L consumiram 18%, 18% e 15% a mais de fósforo respectivamente, do que a cultura controle.

É importante ressaltar que mesmo com crescimento 53% inferior às culturas controle, a cultura tratada com 22,10mg/L de cádmio, no nono dia de crescimento, exibiu consumo 17% superior ao controle. Sendo assim, está evidente que o requerimento de fósforo pelas células cultivadas na presença de cádmio foi muito maior do que a cultura do grupo controle. Também está evidente que os níveis de fósforo

consumidos pelas células cultivadas com cádmio, e que exibiram baixa taxa de crescimento, excedem as necessidades fisiológicas normais. Dessa forma, tais resultados sugerem que o fósforo está sendo usado para suportar o crescimento do fungo na presença do metal. Por conseguinte, pode-se sugerir que o fósforo esteja envolvido no processo de detoxificação de cádmio em *C. elegans*.

Aiking et al. (24), afirmam que a acumulação de fosfato por *Klebsiella aerogenes*, durante crescimento em meio com cádmio, pode ser considerada um mecanismo primário de detoxificação, uma vez que pode ocorrer a formação de fosfato de cádmio, sal pouco solúvel que pode precipitar diminuindo assim a toxicidade do metal. Nishikawa et al. (31), demonstraram que *Chlamydomonas acidophila* apresentou depósitos eletrondensos no interior de vacúolos, constituído de cádmio e fosfato, quando do crescimento na presença deste metal.

Os microrganismos, incluindo os fungos, estocam fosfato principalmente na forma de um polímero denominado de polifosfato. Em termos fisiológicos, o polifosfato em fungos, tem sido considerado de acordo com sua solubilidade em ácido. Assim obtêm-se o polifosfato solúvel e insolúvel em ácido, entretanto outras frações podem ser identificadas dependendo da sua solubilidade em outros solventes (2,4,25).

Neste trabalho foi utilizado, com sucesso, o método descrito em Smirnov et al. (13), o qual permitiu a extração de três distintas frações do polifosfato: fração ácido-solúvel; fração ácido-insolúvel e fração álcali-solúvel.

Em fungos, o polifosfato está localizado na parede celular, citoplasma e vacúolos, assumindo diferentes funções de acordo com sua localização (4).

Campos-Takaki et al. (26), revelaram a presença de polifosfato nas paredes de espécies de Zygomycetes com o emprego da análise por Raios X. Paralelamente, Shari'a et al. (27), demonstraram a presença de polifosfato na superfície celular,

membrana citoplasmática, vacúolos e citoplasma de três espécies de Zygomycetes. Por outro lado, Lima et al. (9), detectaram polifosfato na forma de grânulos elétrondensos em diferentes compartimentos celulares de *C. elegans*, como parede celular, vacúolos, membrana e citoplasma.

Embora as funções fisiológicas do polifosfato não tenham sido totalmente comprovadas, recentemente este polímero tem sido associado à tolerância de microrganismos a metais pesados. Tem sido sugerido que os microrganismos usam o polifosfato para detoxificar os metais pesados (28,29).

Os resultados obtidos demonstraram pela primeira vez o comportamento das distintas frações do polifosfato em *C. elegans* cultivada em meio com cádmio. Portanto os dados aqui apresentados indicam que a participação na tolerância a metais, não é característico para todas as frações do polifosfato.

Não há consenso na literatura a respeito da forma como o polifosfato desempenha seu papel na tolerância aos metais pesados.

Inicialmente, devido à capacidade do polifosfato quelar metais, foi proposto que a capacidade de acumular grande quantidade deste polímero seria suficiente para reduzir a toxicidade dos metais e assim determinar a resistência de um microrganismo (2). Pan-Hou et. al. (30) obtiveram resultados que corroboram esta hipótese.

Recentemente, evidências experimentais suscitaram duas novas hipóteses para explicar a relação do polifosfato com resistência a metais. A primeira afirma que a habilidade de degradar polifosfato a ortofosfato é tão importante para tolerância a metais quanto a capacidade de estocá-lo. Por outro lado, mais recentemente, tem sido proposto que a habilidade de síntese e degradação também é importante no processo de tolerância a metais. Evidências para ambas as hipóteses têm sido demonstradas (31-35).

Os resultados aqui obtidos demonstraram alterações das frações do polifosfato em função do tempo de crescimento e principalmente da concentração de cádmio. No tocante ao polifosfato total, que consiste na soma das três frações, constatou-se que a concentração média do polímero ao longo do crescimento aumentou 6,3% na presença de 5,62mg/L do metal, reduziu 6,3% em 11,24mg/L e culminou com aumento de 20% em 22,10mg/L de cádmio. Estes resultados estão em concordância com a última hipótese, haja vista que, observou-se um balanço entre síntese e degradação do polifosfato de acordo com o aumento da concentração do cádmio.

Com base na concentração média do cádmio durante o crescimento, verificou-se que a fração ácido-insolúvel apresentou maior grau de flutuação em função do aumento do conteúdo do cádmio no meio de cultura. Na concentração inicial de cádmio de 5,62mg/L, os níveis desta fração do polifosfato aumentaram 139% em comparação com as culturas controle, seguido de uma marcante redução de 50% quando da elevação do cádmio para 11,24mg/L e finalizando com um novo aumento de 85% em 22,10mg/L de cádmio.

Por conseguinte as frações de polifosfato que exibiram os maiores níveis de flutuação, em termos de concentração média durante crescimento, em ordem decrescente foram: fração ácido-insolúvel > álcali-solúvel > ácido-solúvel. Portanto, podemos inferir que a fração ácido-insolúvel está envolvida no processo de tolerância de *C. elegans* ao cádmio. Todavia, estudos mais aprofundados precisam ser realizadas para confirmar tais resultados e esclarecer a importância relativa de cada fração do polifosfato na tolerância a metais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FINEP e UNICAP pelo suporte técnico e financeiro.

REFERENCIAS

1. Harold, F.M. Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function. *Bacteriological Reviews*, 16:772-794, 1966.
2. Wood, H.G.; Clarck, J.E. Biological Aspects of Inorganic Polyphosphate. *Annual Reviews of Biochemistry*, 57:253-260, 1988.
3. Kornberg, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*, 177:491-496, 1995.
4. Kulaev, I.S.; Vagabov, V.M.; Kulakovskaya, T.V. New Aspects of Inorganic Polyphosphate Metabolism and Function. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2):111-129, 1999.
5. Rao, N.N.; Liu, S.; Kornberg, A. Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*: The Phosphate Regulon and the Stringent Response. *Journal of Bacteriology*, 180:2186-2193, 1998.
6. Kuroda, A.; Ohtake, H. Molecular Analysis of Polyphosphate Accumulation in Bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 65:304-308, 2000.
7. Kulaev, I.; Kulakovskaya, T. Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Reviews Microbiology*, 54:709-734, 2000.
8. 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*, 65:349-354, 2000.
9. Lima, M.A.B.; Nascimento, A.E.; De Souza, W.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. Effects of Phosphorus on Polyphosphate Accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 363-372, 2003.
10. Rao, N.N.; Roberts, M.F.; Torriani, A. Amount and Chain Length of Polyphosphate in *Escherichia coli* Depend on Cell Growth Conditions. *Journal of Bacteriology*, 162(1):242-247, 1985.
11. Hesseltine, C.W.; Anderson, R.F. Microbiological Production of Carotenóides I. Zygospor and Carotene produced by Intraspecific and crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. *Mycology*, 49:449-452, 1957.
12. Fiske, C.H.; and Subbarow, Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *Journal of Biology Chemistry*, 66:375-400, 1925.

13. Smirnov, A.V.; Kulakovskaya, I.S.; Kulaev, I.S. Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. *Process Biochemistry* 37:643-649, 2002.
14. Mcgrath, J.W.; Quinn, J.P. Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the *Candida humicola* G-1 in Response to Acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4068-4073, 2000.
15. Stohs, D.; Onions, A.H.S. Oxidative mechanisms in the toxicity of heavy metals. *Free Radicals Biology and Medicine*, 18:321-336, 1995.
16. Wang, C.L.; Michels, P.C.; Dawson, S.C.; Kitisakkul, S.; Baross, J.A.; Keasling, J.D.; Clark, D.S. Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10):4075-4078, 1997.
17. Gadd, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytology*, 124:25-60, 1993.
18. Tangaromsuk, J.; Pokethitiyook, P.; Kruatrachue, M.; Upatham, U.S. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology*, 85:103-105, 2002.
19. Massaccesi, G.; Ronero, M.C.; Cazau, M.C.; Bucsinszky, A.M. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:817-820, 2002.
20. Baldrian, P.; Gabriel, J. Intraespecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*, 94(3):428-436, 2002.
21. Plaza, G.; Lukasik, W.; Ulfig, K. Effect of cadmium on growth of pathogenic soil fungi. *Mycopathologia*, 141:93-100, 1998.

22. Souza, P.M.; Marinho, P.H.; Lima, M.A.B. Copper Influence on polyphosphate metabolism of *Cunninghamella Elegans*, Brazilian Journal of Microbiology, 36:315-320, 2005.
23. Gomes, N.C.M.; Mendonca-Hagler, L.C.S.; Savvaidis, I. Metal bioremediation by microorganisms. Reviews of Microbiology, 29:85-92, 1998.
24. Aiking, H.; Stijnman, A.; Garderen, C.V.; Heerikhuizen, H. V.; Riet, J.V. Inorganic Phosphate Accumulation and Cadmium Detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 Growing in Continuous culture. Applied and Environmental Microbiology, 47(2):374-377, 1984.
25. Kornberg, A.; Rao, N.N.; Ault-Riche, D. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. Annual Reviews of Biochemistry, 68:89-125, 1999.
26. 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, 80.1983.
27. Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B.; Campos-Takaki, G.M.; De Souza, W. Polyphosphate in Zygomycetes: A cytochemical study. Brazilian Journal of Microbiology, 33: 119-126, 2002.
28. Keasling, J.D. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. Annals of the New York Academy of Sciences 829(1): 242-249, 1997.
29. Keasling, L.D.; Van Dien, S.J.; Trelstad, P.; Renninger, N.; McMahon, K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. Biochemistry (Moscow), 65:324-331, 2000.
30. Pan-Hou, H.; Kiyono, M.; Omura, H.; Omura, T.; Endo, G. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. FEMS Microbiology Letters, 10325: 159-164, 2002.

31. Nishikawa, K.; Yamakoshi, Y.; Uemura, I.; Tominaga, N. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 44:253-259, 2003.
32. Alvarez, S.; Jerez, C.A. Copper Ions Stimulate Polyphosphate Degradation and Phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9): 5177-5182, 2004.
33. Renninger, N.; Knopp, R.; Nitsche, H.; Clark, D.S.; Keasling, J.D. Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12):7404-7412, 2004.
34. Remonsellez, F.; Orell, A.; Jerez, C.A. Copper tolerance of the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology*, 152: 59-66, 2006.
35. Keasling, J.D.; Hupf, G.A. Genetic Manipulation of Polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:743-746, 1996.

TERCEIRO ARTIGO

REMOÇÃO E ACUMULAÇÃO DE CÁDMIO POR
***Cunninghamella elegans* EM CRESCIMENTO CONTÍNUO**

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico Bioresource Technology.

REMOÇÃO E ACUMULAÇÃO DE CÁDMIO POR
***Cunninghamella elegans* EM CRESCIMENTO CONTÍNUO**

Marcos Antonio Barbosa de Lima ^{a, b}, Bruno Esteves Távora ^a,

Aline Elesbão do Nascimento ^a, Arminda Saconi Messias ^a

Kazutaka Fukushima^c, Galba Maria de Campos Takaki ^{a, b}

^a Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Centro de Pesquisas em Toxicoses Microbianas e Fungos Patogênicos – Universidade de Chiba, Chiba, Japão.

Resumo

O fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* tem sido largamente utilizado devido sua habilidade de metabolizar substâncias xenobióticas e recalcitrantes nocivas ao meio ambiente. Neste sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de remoção e acumulação de cádmio do meio de cultura por *C. elegans*. Os resultados obtidos revelaram que o total de cádmio removido foi dependente da concentração usada. *C. elegans* removeu 92-95% do cádmio adicionado ao meio de cultura ao final do tempo experimental. A acumulação celular do cádmio correspondeu a 75% do metal removido e a taxa de sorção máxima foi 290mg do metal/g de biomassa. Os resultados obtidos nesta pesquisa são superiores aos encontrados na literatura, indicando que *C. elegans* tem grande potencial de utilização em biorremediação *in situ* e *ex situ* de metais, em especial o cádmio.

Palavras-Chave: Metais Pesados; Cádmio; Sorção; Acumulação; *Cunninghamella elegans*

1. Introdução

A poluição ambiental causada por metais pesados tóxicos devido ao desenvolvimento industrial é um dos mais importantes problemas deste século. Em particular, o cádmio é um poluente danoso a vários ecossistemas e para saúde humana. O cádmio, junto com chumbo, tem sido reconhecido como um dos maiores problemas de saúde pública e ambiental. Em humanos, o cádmio pode causar insuficiência renal e pulmonar, lesões ósseas e hipertensão (Jarup et al., 1998; Sharma, 1995). Além do mais, este metal é um agente carcinogênico, embriotóxico, teratogênico e mutagênico (Sato et al., 2002; Waalkes, 2000). As principais fontes de contaminação por cádmio são as indústrias de pigmentos, plásticos e de baterias (Holan et al., 1993; Volesky et al., 1993).

A descontaminação de metais pesados do solo e da água de áreas próximas a indústrias tem sido um grande desafio. O uso de microrganismos para remoção de metais de locais contaminados tem recebido atenção cada vez maior (Vieira e Volesky, 2000). A alta eficiência e baixo custo em concentrações reduzidas de metais fazem dos processos biotecnológicos, os mais vantajosos em comparação aos métodos físico-químicos empregados na remoção de metais (Gomes, 1998; Gupta et al. 2000).

Alguns microrganismos são capazes de tolerar e remover metais pesados (Gomes, 1998; Volesky and Holan, 1995). A capacidade de sorção de metais por microrganismos tem atraído grande atenção devido ao seu potencial de prover uma alternativa econômica e eficiente quando comparado aos processos convencionais de remediação de ambiente contaminado com metais pesados (Lloyd and Lovley, 2001). Os microrganismos capazes de crescer na presença de metais pesados e que apresentem uma significativa capacidade de sorção têm potencial de utilização em biorremediação (Gadd, 1993; Kapoor and Viraraghavan, 1995). Microrganismos vivos e mortos ou seus

derivados podem ser usados para remoção de metais pesados de efluentes (Baik et al., 2002; Franco et al., 2004).

Entretanto, células vivas e em crescimento apresentam a vantagem de remoção ativa contínua de metais pesados após adsorção física e potencial de otimização por manipulação genética (Malik, 2004; Volesky e Holan, 1995). Os fungos, assim como outros microrganismos, podem acumular metais do ambiente. Além do mais, os fungos são capazes de crescer, produzir grande quantidade de biomassa usando meio de crescimento de baixo custo e ao mesmo tempo pode ser manipulado geneticamente e morfológicamente (Kapoor e Viraraghavan, 1995). Adicionalmente, relatos demonstram que os fungos são mais tolerantes aos metais pesados do que as bactérias (Rajapaksha et. al., 2004).

Todavia, há carência de informações acerca da habilidade de sorção de metais pesados por *Cunninghamella elegans*. Esta espécie de fungo, membro representativo da Ordem Mucorales, tem sido muito estudada, devido a sua capacidade de metabolizar xenobióticos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes têxteis e várias drogas farmacêuticas (Cerniglia et al., 1984; Zhang et al., 1996; Pothuluri et al., 1998; Ambrosio et al., 2004). Portanto, esta pesquisa teve como objetivo investigar as propriedades de sorção de cádmio de *C. elegans*.

2. Métodos

2.1. Microrganismo e condições de cultivo

Cunninghamella elegans IFM 46109 gentilmente cedida pela coleção de culturas do Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University- Japan, foi mantida em BDA (Batata Dextrose Agar) a 5°C, sendo transferida para BDA a cada intervalo de seis meses. O BDA também foi usado para esporulação a 28°C, durante 5 dias.

Suspensão de esporos na concentração de 10^5 células/mL foi preparada e transferida para frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 50 mL de Meio Sintético para Mucorales (SMM) descrito por Hesseltine and Anderson (1957) acrescido de cloreto de cádmio nas concentrações de 5.62mg/L; 11.24mg/L e 22.10mg/L. As culturas controle foram crescidas no meio original sem cádmio. Os frascos foram incubados durante 15 dias, a 28°C sob agitação de 250 rpm. Todos os experimentos foram realizados usando três réplicas.

2.2. Cinética de remoção de cádmio

Para avaliar a remoção de cádmio pelo micélio de *C. elegans*, amostras de sobrenadante de cultura foram coletadas em intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo. A concentração do metal foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, com lâmpada específica para cádmio e em comprimento de onda específico. Uma curva padrão foi produzida. Experimentos foram conduzidos em triplicata e os valores médios foram usados na análise. O percentual de remoção de cádmio foi calculado através da seguinte relação: concentração de cádmio removido/concentração de cádmio inicial x 100.

A eficiência de remoção de metal pesado, q (mg metal/g biomassa seca) foi calculada usando a seguinte equação: $q = (C_0 - C_f)/m$, onde C_0 e C_f são a concentração inicial e final do metal (mg/L), respectivamente e m a biomassa seca (g).

2.3. Acumulação de cádmio

O cádmio presente no micélio de *C. elegans* foi avaliado. A biomassa coletada com 3 e 6 dias de incubação na presença de cádmio em diferentes concentrações foi lavada três vezes com ácido tetrácetico etilenodiamina (EDTA) na concentração de 0.1M, durante 10 minutos. Após este período, a biomassa foi seca e digerida com uma solução ácida constituída por ácido nítrico (HNO_3) e perclórico (HClO_4) concentrado na proporção de (9:1), durante 6 h a 150°C . Em seguida, o material digerido foi diluído com HCL 1N e analisado para determinação do cádmio por espectrofotometria de absorção atômica. Estes experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios foram usados.

3. Resultados e discussão

3.1. Remoção de cádmio

A figura 1 apresenta a evolução do percentual de remoção de cádmio em diferentes concentrações iniciais em função do tempo.

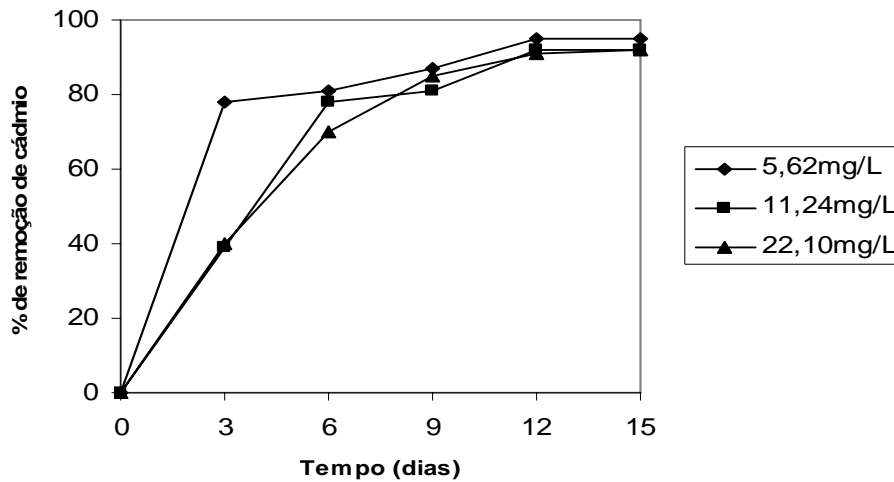


Fig. 1. Percentual de remoção de cádmio do meio de cultura por *C. elegans*.

Uma análise da figura 1 mostra que o processo de sorção pode ser dividido em dois estágios. O primeiro estágio da cinética de sorção para a concentração inicial do metal de 5.62mg/l terminou ao terceiro dia de contato sendo responsável por 78% do cádmio removido. Para as maiores concentrações do metal, 11.24mg/l e 22.10mg/l, o primeiro estágio da cinética de sorção foi mais longo, correspondendo a seis dias de contato, onde 78% e 70% do cádmio adicionado foi removido, respectivamente.

Estes resultados confirmam informações da literatura as quais têm demonstrado que células metabolicamente ativas quando utilizadas para remoção de metais apresentam um padrão de sorção bifásico. No estágio inicial a taxa de sorção é muito alta e ocorre em um curto período de tempo, no segundo estágio a taxa de sorção é muito baixa e ocorre em um período de tempo maior e sua contribuição para a sorção total de metal é muito pequena (Donmez and Aksu, 2001; Malik, 2004).

A taxa de sorção de cádmio foi dependente da concentração inicial do metal, variando proporcionalmente com o conteúdo do cádmio usado. O percentual de remoção de cádmio ao final do tempo experimental foi 95%, 92% e 92% para as concentrações iniciais 5.62 mg/L, 11.24 mg/L e 22.10mg/L de cádmio, respectivamente.

A mais alta remoção de cádmio de 95% ocorreu na menor concentração inicial do metal usado, 5.62mg/L. Entretanto, o valor máximo da capacidade de remoção foi obtido com a concentração de 22.1 mg/L (maior concentração inicial) de cádmio, e correspondeu a 20.4 mg/L em 15 dias. Assim sendo, a taxa de remoção de cádmio foi inversamente proporcional a concentração de metal inicial.

Comportamento semelhante foi obtido por Devars et al. (1998). Além disso, esses autores demonstraram que duas cepas de *Euglena gracilis*, alga fotossintética, foram capazes de remover apenas 67% e 64% de cádmio do meio nas concentrações iniciais de 50 μ M ou 5,62 mg/L e 100 μ M ou 11,24mg/L, respectivamente. Nestas mesmas concentrações iniciais a remoção de cádmio por *C. elegans* foi 28% maior.

Massaccesi et al. (2002), estudando a capacidade de remoção de cádmio de 7 espécies de fungos filamentosos do solo, isolados de uma área industrial poluída com metais pesados, durante crescimento em meio com 10mg/L de cádmio, observaram que o percentual máximo de remoção do metal ficou em torno de 70%. Resultado inferior ao apresentado por *C. elegans* na presença da mesma concentração de cádmio.

Neste sentido, dentre 8 espécies de leveduras utilizadas para remoção de cádmio, na concentração de 22mg/L, do meio de cultivo, a maior taxa de remoção correspondeu a 29% obtida pela espécie *Sporobolomyces roseus* (Breierova et al., 2002).

Matsunaga et al. (1999) demonstraram que a capacidade máxima de remoção de cádmio de 5 cepas de Cianobactérias foi 10,8% e de 19 cepas da alga verde *Chlorella* correspondeu a 48,7%. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que *C. elegans*

exibe uma grande capacidade de remoção de cádmio em concentrações tóxicas deste metal.

A sorção do cádmio atingiu o equilíbrio em doze dias de incubação, em todas as concentrações iniciais utilizadas, indicando que o tempo de equilíbrio foi independente da concentração de metal inicial. O tempo de equilíbrio depende do tipo de biomassa, metal utilizado e estado fisiológico da biomassa, variando segundo estes parâmetros. Aksu e Kutsal, 1991 e Nourbakhsh et al., 1994 apresentaram valores para o tempo de equilíbrio os quais variam de 15 minutos a mais dez dias.

Neste trabalho, embora a maior quantidade de cádmio tenha sido removida nos intervalos iniciais de incubação, 3 e 6 dias, o equilíbrio só foi alcançado no décimo segundo dia.

3.2. Eficiência de remoção do cádmio

A Figura 2 mostra a relação entre a concentração de metal biosorvido e a biomassa produzida. A eficiência de remoção foi determinada através da equação: $q = (C_0 - C_f)/m$. As isotermas de equilíbrio não foram determinadas, porque o fungo está metabolicamente ativo, assim a sorção do cádmio pode não ficar restrita a fenômeno de superfície.

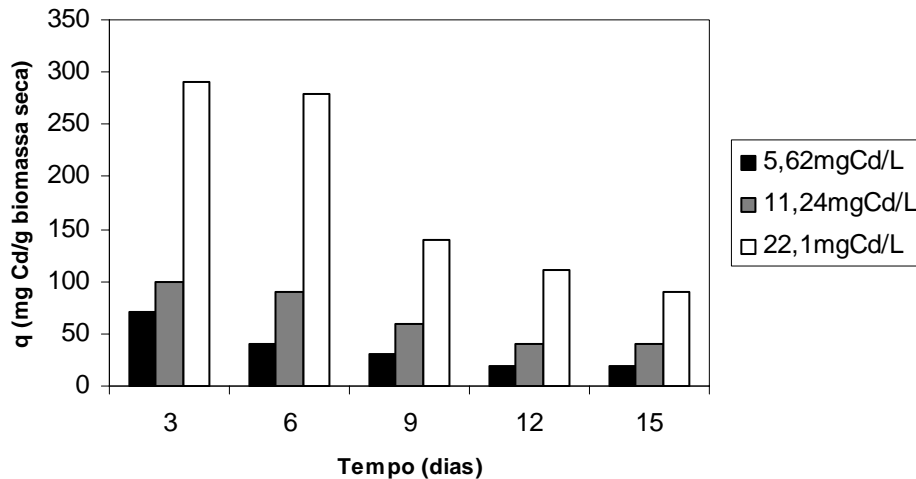


Fig. 2. Eficiência de remoção de cádmio por *C. elegans*.

Os resultados demonstraram que o valor de q aumentou com a elevação na concentração inicial de cádmio. A mais alta eficiência de remoção ocorreu nos estágios iniciais de incubação, ou seja, nos intervalos de 3 e 6 dias. Após este período, o valor de q declinou continuamente com o tempo experimental, como resposta a diminuição da proporção cádmio/biomassa. A sorção máxima do cádmio correspondeu a 290mg/g no terceiro dia de experimento.

Recentemente, Malik (2004) em uma revisão bibliográfica relatou que a eficiência máxima de sorção de cádmio para vários fungos foi 184mg/g para a espécie *Gliocladium roseum*. Em adição, Kapoor e Viraraghavan (1995) divulgaram valores de remoção máxima de cádmio que variaram entre 0.4 and 71mg/g para várias espécies de fungos. Volesky e Holan (1995) observaram que o maior nível de remoção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* ocorreu durante a fase exponencial de crescimento e correspondeu a 70mg Cd/g.

Massacesi et al. (2002), relataram que a eficiência máxima de remoção de cádmio por 7 espécies de fungos foi pouco mais de 180mg Cd/g e Doyle et al. (1975) observaram que *Aspergillus niger* foi capaz de remover 154,8mg Cd/g de biomassa.

O desempenho na sorção de cádmio pelo micélio de *C. elegans* quando comparado aos resultados divulgados na literatura citada anteriormente pode ser considerado promissor, haja vista os altos valores obtidos neste estudo.

Por outro lado, El-Morsy (2004) observou que a biomassa de *Cunninghamella echinulata* é capaz de remover com alta eficiência metais como Pb, Cu e Zn de soluções aquosas. Além do mais, Franco et al., (2004) demonstraram que quitina e quitosana extraída de *C. elegans* apresentou excelente desempenho de remoção de íons de Pb^{+2} , Fe^{+2} e Cu^{+2} .

3.3. Acumulação celular do cádmio

Os resultados de acumulação de cádmio por *C. elegans* são apresentados na figura 3. As células foram lavadas com EDTA antes da análise sugerindo acumulação intracelular.

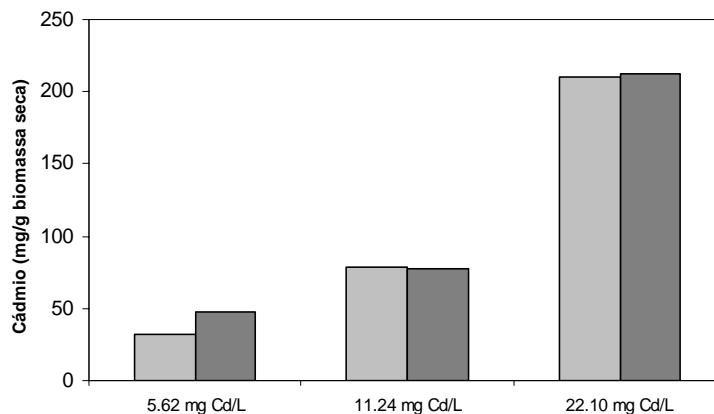


Fig. 3. Acumulação de cádmio por *C. elegans*. 3 dias (coluna cinza clara) e 6 dias (coluna cinza escura) de contato com 5.62 mg/L, 11.24 mg/L e 22.10mg/L de cádmio.

A acumulação de cádmio pelas hifas aumentou com a concentração de metal externa, porém não com o tempo de incubação, exceto para a concentração inicial de

5.62mg/l. Dessa maneira, nas concentrações de 11.24mg/L e 22.10mg/L de cádmio houve saturação da biomassa com de 3 dias de cultivo.

Padrão de acumulação de cádmio similar foi reportado por Nishikawa et al., (2003) usando a microalga *Chlamydomonas acidophila*. Entretanto a taxa de acumulação foi muito baixa quando comparada aos dados obtidos neste trabalho com *C. elegans*. Costa and Duta (2001) testando diferentes espécies de *Bacillus* também observaram um aumento de sorção relacionado a concentração inicial de cádmio no meio.

A acumulação máxima de 212mg/g foi obtida pelas células tratadas com 22.10mg/l de cádmio em seis dias de incubação. Este valor correspondeu a 75% do cádmio sorvido, indicando que o principal processo de remoção de cádmio por *C. elegans* foi bioacumulação.

Entre os microrganismos, várias espécies de fungos estão sendo estudadas ou já estão sendo utilizados em processos de remediação de metais pesados. O potencial de remoção de metais pesados de soluções aquosas de espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Saccharomyces* têm sido descrito por diversos autores (Kapoor and Viraraghavan, 1995; Kapoor et al., 1999; Plaza et al., 1996; Yan and Viraraghavan, 2003).

A espécie *C. elegans* exibiu a habilidade de acumular cádmio quando metabolicamente ativo. Malik (2004) relatou que células em crescimento ativo têm várias vantagens de utilização em remediação de metais do que células inativas.

Neste trabalho, a capacidade de *C. elegans* remover e acumular cádmio foi avaliada pela primeira vez, indicando o seu potencial como um biosistema para bioremediação.

4. Conclusões

Neste estudo, um isolado de *C. elegans* metabolicamente ativo foi usado com sucesso para remoção e acumulação de cádmio. *C. elegans* foi capaz de remover 92-95% do cádmio do meio de cultura. Paralelamente, exibiu uma eficiência de remoção de 290mg/g em meio de cultura contendo 22.10mg/L de metal após 3 dias de incubação. Além do mais, os resultados deste estudo mostraram que este fungo foi capaz de acumular 75% do cádmio sorvido.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FINEP e UNICAP pelo suporte técnico e financeiro.

Referências

- Aksu, Z., Kutsal, T., 1991. A bioseparation process for removing lead (II) ions from waste water by using *C. vulgaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 52 (1), 109-118.
- Ambrósio, S.T., Campos-Takaki, G.M., 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresource Technology* 91(1), 69-75.
- Baik, W.Y., Bae, J.H., Cho, K.M., Hartmeier, W., 2002. Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof. *Bioresource Technology* 81, 167-170.
- Breierova, E., Vajcziková, I., Sasinková, V., Stratilová, E., Fisera, M., Gregor, T., Sajbidor, J., 2002. Biosorption of Cadmium Ions by Different Yeast Species. *Zeitschrift Naturforsch.* 57 (c), 634-639.

- Cerniglia, C.E., Lambert, K.J., Miller, D.W. Freeman, J.P., 1984. Transformation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Cunninghamella elegans*. Applied and Environmental Microbiology 47 (1), 111-118.
- Costa, A.C.A., Duta, F.P., 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. Brazillian Journal of Microbiology 32, 1-5.
- Devars, S., Hernández, R., Moreno-Sánchez, R., 1998. Enhance heavy metals tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 34, 128-135.
- Donmez, G., Aksu, Z., 2001. Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida sp.* Water Research 35, 1425-1434.
- Doyle, J.J., Marshall, R.T., Pfander, W.H., 1975. Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms. Applied Microbiology 29(4), 562-564.
- El-Morsy, E.S.M., 2004. *Cunninghamella echinulata* a new biosorbent of metal ions from polluted water in Egypt. Mycologia 96(6), 1183–1189.
- Franco, L.O., Maia, R.C.C., Porto, A.L.F., Messias, A.S., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M., 2004. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). Brazillian Journal of Microbiology 35, 243-247.
- Gadd, G.M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytology 124, 25-60.

- Gomes, N.C.M., Mendonca-Hagler, L.C.S., Savvaidis, I., 1998. Metal bioremediation by microorganisms. *Reviews of Microbiology* 29, 85-92.
- Gupta, R., Ahuja, P., Klan, S., Saxena, R.K., Mohapatra, H., 2000. Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science* 78 (8), 967-973.
- Hesseltine, C.W., Anderson, R.F., 1957. Microbiological production of carotenoides I. zygospore and carotene produced by intraspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycology* 49, 449-452.
- Holan, Z.R., Volesky, B., prasetyo, I., 1993. Biosorption of Cd by biomass of marine algae. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 819-825.
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G. M., 1998. Health effects of cadmium exposure – A review of the literature and a risk estimate. *Scand Journal of Work Environmental Health* 24 (3), 240.
- Kapoor, A., Viraraghavan., 1995. Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 53, 195-206.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R., 1999. Removal of heavy metal using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 70, 95-104.
- Lloyd, J.R., Lovley, D.R., 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion of Biotechnology* 12, 248-253.

- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261-278.
- Massaccesi, G., Ronero, M.C., Cazau, M.C., Bucsinszky, A.M., 2002. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 817-820.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A., 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Journal of Biotechnology* 70, 3-38.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N., 2003. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 253-259.
- Nourbakhsh, M., Sag, Y., Özer, D., Aksu, Z., Verkobachar, C., 1991. Biosorption: an attractive alternative for removal of chromium (VI) ions from industrial wastewaters. *Process Biochemistry* 29, 1-5.
- Plaza, G., Lukasik, W., Ulfig, K., 1996. Sorption of cadmium by filamentous soil fungi. *Acta Microbiologia Polonica*. 45 (2), 193-201.
- Pothuluri, J.V., Sutherland, J.B.; Freeman, J.P.; Cerniglia, C.E., 1998. Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3106-3109.

- Rajapaksha, R.M.C.P.; Tobor-Kaplon, M.A.; Baath, E., 2004. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5), 2966–2973.
- Satoh, M.; Koyama, H.; Kaji, T.; Kito, H.; Tohyama, C., 2002. Perspectives on cadmium toxicity research. *Journal of Experimental Medicine* 196, 23-32.
- Sharma, Y.C., 1995. Economic treatment of cadmium (II)-rich hazardous waste by indigenous material. *Journal of Applied Interfacial Science* 173 (1), 66-70.
- Vieira, R.H.S.F., Volesky, B., 2000. Biosorption: a solution to pollution?. *International Microbiology* 3, 17–24.
- Volesky, B., May, H., Holan, Z.R., 1993. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 826–829.
- Volesky, B., Holan, Z.R., 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* 11, 235-250.
- Waalkes, M.P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79, 241-244.
- Yan, G., Viraraghavan, T., 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research* 37, 4486-4496.
- Zhang, D., Freeman, J.P., Sutherland, J.B., Walker, A.E., Yang, Y., Cerniglia, C.E., 1996. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 798-803.

CONCLUSÕES GERAIS

PRIMEIRO ARTIGO

- # O cultivo em presença de cádmio induziu o surgimento de variações na forma, arranjos e distribuição do citoesqueleto de actina em *C. elegans*;
- # As variações no citoesqueleto foram diretamente proporcionais à concentração do metal;
- # O cádmio induziu alterações de eletrondensidade, vacuolização, na textura do citoplasma e no surgimento de inclusões e granulações citoplasmáticas;
- # O cádmio induziu variações na expressão/distribuição de carboidratos ácidos na superfície das células;
- # O cádmio alterou a permeabilidade da membrana citoplasmática, uma vez que foi observada a existência de produtos de reação citoquímica para o vermelho de rutênio no citoplasma das células tratadas com este metal.

SEGUNDO ARTIGO

- # *Cunninghamella elegans* é capaz de resistir e crescer em meio de cultura contendo cádmio na concentração de 22,10mg/L;
- # O requerimento de fosfato em *Cunninghamella elegans* aumenta durante o crescimento na presença de cádmio em diferentes concentrações;
- # As distintas frações do polifosfato exibiram variações em seu conteúdo em resposta ao cádmio;
- # A fração ácido-insolúvel do polifosfato apresentou maior grau de variação de seu conteúdo em presença do cádmio.

TERCEIRO ARTIGO

O fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* tem grande capacidade de remover e acumular cádmio de meio de cultura;

Cunninghamella elegans demonstrou elevado coeficiente de remoção (q) de cádmio de meio de cultura.