

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

METABOLISMO DO DIBENZOTIOFENO POR *Cunninghamella*
elegans ASSOCIADOS AOS ESTUDOS MORFOLÓGICOS E
ULTRAESTRUTURAIS

PATRÍCIA MENDES DE SOUZA

Recife - PE
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PATRÍCIA MENDES DE SOUZA

METABOLISMO DO DIBENZOTIOFENO POR *Cunninghamella elegans* ASSOCIADOS AOS ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS

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
2008

COMISSÃO EXAMINADORA

Galba Maria de Campos Takaki

Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki (Orientadora)
Departamento de Química – NPCIAMB, UNICAP, Recife, PE

Profa. Dra. Thayza C. Montenegro Stamford
Faculdade Integrada de Patos - PB

Norma Gusmão

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Departamento de Antibióticos – UFPE, Recife, PE

Profa. Dra. Mabel Calina de França Paz
Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará, Fortaleza, CE

Profa. Dra. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Faculdade Integrada de Patos, Patos, PB

"Assim como as pedras preciosas são tiradas da terra, a virtude surge dos bons atos e a sabedoria nasce da mente pura e tranqüila. Para se andar com segurança, nos labirintos da vida humana, é necessário que se tenham como guias a luz da sabedoria e virtude".

Sakyamuni

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus pais, José Tadeu de Souza (in memorian) e Maria de Lourdes Mendes de Souza pelo apoio, educação, incentivo, paciência e amizade.

Ao meu querido e amado esposo, Michel Guimarães Soares, amigo e companheiro de vida, que enche meu caminhar com amor, aventura e alegria.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

À amiga Michelle Rose, pela amizade sincera, momentos de apoio e companheirismo.

Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Alicia Jara, Raquel Rufino, Marcos Moraes, Thayse Lima, Luiza Bastos, Juliana Luna, Marta Cristina Silva, Gabrielle Moura, Hélvia Walewska Araújo, Rosileide Fontenelle e Adriana Lima pelos momentos de descontração e apoio nas horas de trabalho;

Aos técnicos Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana e a secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Sônia Maria de Souza pela presteza dos seus serviços;

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

Às Coordenadoras do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Prof^a. Dr^a. Leonor Costa Maia e Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão pelo excelente trabalho realizado;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos pelos conhecimentos transmitidos;

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

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. Introdução.....	7
2. Revisão Bibliográfica.....	10
2.1. Poluição Ambiental por Petróleo.....	10
2.2. Compostos Organosulfurados.....	12
2.2.1. Métodos de Remoção do Enxofre.....	14
2.2.2. Vias Metabólicas Degradativas do Dibenzotiofeno.....	16
2.3. Fungos: Classe Zygomycetes.....	22
2.3.1. Gênero <i>Cunninghamella</i>	23
2.4. Citoesqueleto de Actina.....	24
2.5. Ultraestrutura.....	25
Referências.....	28

PRIMEIRO ARTIGO

Título – Metabolismo do Dibenzotiofeno por *Cunninghamella elegans*

Resumo.....	48
1. Introdução.....	49
2. Materiais e Métodos.....	50
2.1. <i>Microrganismo e Condições de Cultivo</i>	50

2.2. Degradação de Dibenzotiofeno (GC-MS).....	51
3. Resultados.....	52
4. Discussão.....	58
5. Conclusões.....	64
Agradecimentos.....	64
Referências.....	65

SEGUNDO ARTIGO

Título - Efeito do Dibenzotiofeno no Crescimento, na Morfologia e na Ultraestrutura de *Cunninghamella elegans*

Resumo.....	72
1. Introdução.....	73
2. Métodos.....	74
2.1. Microrganismo e Condição de Cultivo.....	74
2.2. Perfil de Crescimento de <i>C. elegans</i>	75
2.2.1. Determinação da Curva de Crescimento.....	75
2.2.2. Determinação do pH.....	75
2.2.3. Determinação do Teor de Glicose.....	76
2.2.4. Determinação das Proteínas Totais.....	76
2.3. Estudos Morfológicos.....	76
2.3.1. Microscopia Óptica.....	76
2.3.2. Microscopia de Fluorescência - Filamentos de Actina (Shari'a et al., 1999).....	77
2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (De Souza, 2000).....	77

3. Resultados.....	78
3.1. Perfil de Crescimento de <i>C. elegans</i>	78
3.2. Estudos Morfológicos.....	81
4. Discussão.....	87
5. Conclusões.....	90
Agradecimentos.....	90
Referências.....	92

TERCEIRO ARTIGO

Título - Efeito do Dibenzotiofeno na Ultraestrutura de *Cunninghamella elegans*

Resumo.....	100
1. Introdução.....	101
2. Materiais e Métodos.....	102
2.1. Microrganismo e Condição de Cultivo.....	102
2.2. Estudos Ultraestruturais.....	103
2.2.1. Técnica de Rotina (De Souza, 2000).....	103
2.2.2. Citoquímica Enzimática para Catalase (Robinson & Karnovsky, 1983).....	103
3. Resultados.....	104
4. Discussão.....	109
5. Conclusões.....	112
Agradecimentos.....	112
Referências.....	114

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Estrutura molecular de alguns compostos orgânicos contendo enxofre.....	13
Figura 2. Via degradativa do dibenzotiofeno. Via de Kodama; o átomo de enxofre não é removido, havendo ruptura de ligações C-C (Kilbane & Jackowsky, 1992).....	17
Figura 3. Via degradativa do dibenzotiofeno. Via de Van Afferden ou Via Dioxigenação Angular; o enxofre é removido na forma de íon sulfito ocorrendo a ruptura da estrutura carbonada e o produto final formado é o Ácido Benzóico (Van Afferden <i>et al.</i> , 1990, Nojiri <i>et al.</i> , 2001).....	19
Figura 4. Via degradativa do dibenzotiofeno. Via “4S”; o enxofre é removido na forma de sulfito, permanecendo intacta a estrutura carbonada (Gallagher <i>et al.</i> , 1993).....	21

Primeiro Artigo

Figura 1. Degradação do dibenzotiofeno por <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 596) em função do tempo. O meio de cultura utilizado foi Sabouraud líquido, contendo 0,5mM, 1,0mM e 2,0mM de DBT, à 28°C, por 96 horas, 150rpm.....	53
Figura 2. Proposta de via metabólica utilizada por <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 596) para remover o enxofre do DBT inserido no meio de cultura Sabouraud líquido, nas concentrações de 0,5mM, 1,0mM e 2,0mM, 28°C, 150rpm.....	54
Figura 3. Proposta de via metabólica utilizada por <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 596) para remover o enxofre do DBT inserido no meio de cultura Sabouraud líquido, nas concentrações de 0,5mM, 1,0mM e 2,0mM, 28°C, 150rpm.....	55

Figura 4. Espectrograma de massa de 5-Óxido Dibenzotiofeno metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por <i>Cunningamella elegans</i> após 48 horas de crescimento. A, 5-Óxido Dibenzotiofeno; A.1, 5- Óxido Dibenzotiofeno (Gai et al., 2007).....	56
Figura 5. Espectrograma de massa de 5-5 Dióxido Dibenzotiofeno metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por <i>Cunningamella elegans</i> após 48 horas de crescimento. A, 5-5 dióxido Dibenzotiofeno; A.1, 5-5 dióxido Dibenzotiofeno (Spectral Database for Organic Compounds SDBS library).....	57
Figura 6. Espectrograma de massa de 2- Hidroxibifenil metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por <i>Cunningamella elegans</i> após 72 horas de crescimento. A, 2- Hidroxibifenil; A.1, 2- Hidroxibifenil (Castorena, 2002).....	57
Figura 7. Espectrograma de massa de Ácido Benzóico metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por <i>Cunningamella elegans</i> após 72 horas de crescimento. A, Ácido Benzóico; A.1, Ácido Benzóico (Spectral Database for Organic Compounds SDBS library).....	58
Figura 8. Propostas de vias de degradação do dibenzotiofeno. (I) Dibenzotiofeno, (II) 1,2 - Dihidroxi-1,2-dihidrodibenzotiofeno, (III) 3-hidroxi-2-formil benzotiofeno, (IV) Bifenil, (V) Ácido Benzóico, (VI) 2-Hidroxibifenil e (VII) 5-Óxido dibenzotiofeno.....	61

Segundo Artigo

Figura 1. Curva de Crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> UCP-596. Determinação do pH, determinação da biomassa e proteínas totais. <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada em Sabouraud Líquido: sem dibenzotiofeno (controle) e com 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de dibenzotiofeno (tratados), à 28°C, 150 rpm, período de 96 horas.....	80
--	----

Figura 2. Padrões de Ramificações de *Cunninghamella elegans* UCP-596 em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Controle (A e A1), 0,5mM de DBT (B e B1), 1,0mM de DBT (C e C1) e 2,0mM de DBT (D e D1); Incubados à 28°C, no período de 24 e 48 horas: hifa ('), ramificações de hifas (g), aumento de 400X (A, B, C e D) e 1000X (A1, B1, C1 e D1).....82

Figura 3. Microscopia de Fluorescência de *Cunninghamella elegans* (UCP-596), cultivada em meio de cultura Sabouraud líquido: Controle (A e A1); meio de cultura Sabouraud contendo 0,5mM (B e B1); 1,0mM (C e C1) e 2,0mM (D e D1) de dibenzotiofeno. Incubados à 28°C, 48 horas. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina, com aumento de 1000X. Filamentos e placas de actina em diferentes áreas das hifas (r), parede celular (').....84

Figura 4. Eletronmicrografias de varredura de *Cunninghamella elegans* UCP-596, cultivada em meio de cultura Sabouraud líquido: Controle (A e A1); meio de cultura Sabouraud contendo 0,5mM (B e B1); 1,0mM (C e C1) e 2,0mM (D e D1) de dibenzotiofeno. Incubados à 28°C, 48 horas. Corpos globosos (g); hifas ('). Aumento de 1000X.....86

Terceiro Artigo

Figura 1. Eletronmicrografia de *Cunninghamella elegans* UCP-596, em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Técnica de Rotina. Controle (A e A1), aumento de 14.000X; 0,5mM de DBT (B e B1), aumento de 14.000X, 1,0mM de DBT (C e C1), aumento de 27.000X e 20.000X respectivamente; e 2,0mM de DBT (D e D1), aumento de 5.000X e 14.000X, respectivamente. Núcleo (N), Mitocôndrias (m), Vacúolos (V), Corpos Eletrondensos (C), Parede Celular (â), Membrana Citoplasmática (Ú).....106

Figura 2. Eletronmicrografia de *Cunninghamella elegans* UCP-596, em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Citoquímica para Catalase. Controle (A e A1), aumento de 40.000X e 27.000X, respectivamente; 0,5mM de DBT (B e B1), aumento de 20.000X e 27.000X, respectivamente; 1,0mM de DBT (C e C1), aumento de 20.000X e 27.000X, respectivamente; e 2,0mM de DBT (D e D1), aumento de 27.000X e 14.000X, respectivamente: Núcleo (N), Mitochondrias (m), Vacúolos (V), Corpos Eletrondensos (C), Parede celular (â), Membrana Citoplasmática (Ú), Produtos de Reação (á).....108

LISTA DE TABELAS

Primeiro Artigo

Tabela 1. Caracterização do espectro de massa dos produtos da degradação do DBT por *C. elegans* (UCP 596).....53

Resumo

Considerando o potencial biotecnológico de *Cunninghamella elegans* em degradar compostos recalcitrantes do meio ambiente, este trabalho teve como finalidade investigar a degradação do dibenzotiofeno por *C. elegans* associados a estudos morfológicos e ultraestruturais. As amostras tratadas com DBT foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC-MS. Os metabólitos formados, pelo processo de biodegradação do DBT foram 5-óxido dibenzotiofeno, 5,5-dióxido dibenzotiofeno, 2-hidroxibifenil, resultados que sugerem a utilização da via metabólica “4S” pelo fungo. Uma segunda via metabólica também é sugerida a via dioxigenação angular, que utiliza o DBT como fonte de carbono, remove o enxofre em forma de sulfito e sulfato e tem como produto final o ácido benzóico. O perfil de crescimento demonstrou que o crescimento de *C. elegans* foi estimulado pelas concentrações 0,5mM, 1,0mM e 2,0mM de DBT. O total de proteínas extracelulares revelou variações nas condições estudadas. A morfologia de *C. elegans* apresentou alterações no padrão de ramificação das hifas, variação na forma das ramificações, tornando-se mais curtas, delgadas, bifurcadas, bilaterais ou unilaterais e aparecimento de protuberância na base da ramificação primária em função da concentração do dibenzotiofeno. A análise por microscopia de fluorescência demonstrou variação na distribuição, forma e localização de filamentos de actina. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que hifas de *C. elegans* em presença de DBT apresentaram menor eletrondensidade, intensa ramificação e corpos intracelulares em diferentes formas e tamanhos. Com a microscopia eletrônica de transmissão foram observadas modificações relativas à quantidade e tamanho de corpos eletrondensos e vacúolos na hifa, menor quantidade de mitocôndrias, variações na textura e eletrondensidade na parede celular. O estudo citoquímico para catalase revelou variações na intensidade e distribuição de produtos de reação na parede celular e no citoplasma nas amostras tratadas com DBT. O presente estudo confirmou o potencial biotecnológico de *C. elegans* no processo de biodegradação de DBT.

Palavras-chave: *Cunninghamella elegans*; Biodessulfurização; Dibenzotiofeno; Morfologia; Ultraestrutura; Catalase.

Abstract

Considering the biotechnological potential of *Cunninghamella elegans* related to recalcitrant compounds in the environment the aim of this work was to evaluate the dibenzothiophene (DBT) degradation in association with morphological and ultrastructural aspects. Samples treated with DBT were submitted to gas chromatography coupled to mass spectrometry - GC-MS. The metabolites related to DBT degradation obtained were 5-oxide dibenzothiophene, 5,5-dioxide dibenzothiophene, 2- hydroxybiphenyl, results which suggest the utilization of 4S metabolic pathway. A second metabolic pathway is also suggested by angular dioxygenation, in which DBT is used as carbon source, and remove the sulfur in sulphite or sulphate form, and the final intermediate is the benzoic acid. The study also revealed that *C. elegans* growth profile was stimulated by all DBT concentrations. The total extracellular proteins varied according to DBT concentrations related to control. The cellular morphology study revealed variations in the branching pattern, form, with hyphae more short, thin, bifurcated, bilateral or unilateral and also demonstrated the presence of protuberances related to DBT concentration. The fluorescence microscopy revealed variations in actin cytoskeleton related to distribution, form and localization of reaction products. The use of scanning electron microscopy revealed alterations induced by DBT concentrations related to electron density, branching and presence of cellular bodies. The transmission electron microscopy revealed variations related to the presence of electron dense bodies, vacuoles, mitochondria and alterations related to cell wall electron density and cellular texture. The catalase citochemical analysis revealed variations in the intensity and distribution of reaction products in the cell wall and cytoplasm of samples treated with DBT. This study revealed the biotechnological potential of *C. elegans* in the DBT degradation.

Keywords: *Cunninghamella elegans*; Biodesulfurization; Dibenzothiophene; Morphology; Ultrastructure; Catalase.

1. Introdução

Os hidrocarbonetos presentes no petróleo são de três classes: parafínicos, naftênicos e aromáticos. Os outros elementos presentes aparecem sob a forma de compostos orgânicos, os quais em alguns casos formam complexos organometálicos, o enxofre pode estar presente na forma inorgânica, H_2S e elementar. Dentre os produtos derivados, o óleo diesel, que é um combustível de composição complexa constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio. Estes hidrocarbonetos são normalmente formados por moléculas constituídas de 8 a 40 átomos de carbono, sendo, portanto, mais pesados do que aqueles que compõem a gasolina. O óleo diesel é formulado através da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (Oliveira, 2001, Yu et al., 2006, Li et al., 2007).

Outrossim, o desenvolvimento dos processos industriais induziu o surgimento de novos compostos químicos sintéticos, que por sua vez, são lançados no meio ambiente indiscriminadamente. Muitos destes compostos, chamados xenobióticos ocorrem na natureza ou são suficientemente similares a estes, estando sujeitos ao metabolismo microbiano. Estes compostos que resistem a biodegradação ou não são metabolizados completamente, acumulam-se no ambiente, sendo considerados recalcitrantes ou persistentes (Atlas e Bartha, 1992).

O petróleo e o carvão mineral são importantes combustíveis fósseis com uma composição complexa em que se podem considerar quatro famílias de compostos: hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, cíclicos e moléculas contendo nitrogênio, enxofre ou oxigênio na estrutura. A presença destes elementos é indesejável não só por contribuir para a corrosão do equipamento da

refinaria, mas também porque, quando sofrem combustão liberam dióxido de enxofre SO₂, um dos principais poluentes atmosféricos responsáveis pelas chuvas ácidas (Denome et al., 1993, Cara et al., 2006). Processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de compostos organosulfurados derivados do petróleo. Contudo compostos tiofênicos, como o dibenzotiofeno (DBT), são refratários a dessulfurização química, sendo, portanto um composto modelo para a biodessulfurização (Weber e Corseuil, 1994, Corseuil e Alvarez, 1996, Li et al., 2003, Abbad-Andaloussi et al., 2003, Gai et al., 2007).

Dentre os fungos, os Zygomycetes, são utilizados em processos de biodeterioração, biodegradação e exibem potencial para a indústria relacionado a produção de enzimas, ácidos graxos, antibióticos, conservantes e ácido lático (Dube, 1978, Tombs e Blake, 1982, Endo et al., 1985, Kapoor e Viraraghavan, 1995, Volesky e Holan, 1995, Alexopoulos, 1996, Carlile e Watkinson, 1996, Herrera e Ulloa, 1998, Baik et al., 2002, Mahony et al., 2002). A literatura revela um crescente aumento dos estudos com espécies do gênero *Cunninghamella* devido sua habilidade de metabolizar compostos xenobióticos através da excreção de hidrolases. Desta forma, estes organismos são estudados em função do seu potencial nos processos de biodegradação e biotransformação (Bajjal e Mehrotra, 1980, Reddy et al., 1991, Foster *et al.*, 1991, Pothuluri et al., 1992, Cervantes e Gutierrez-Corana, 1994, Schwartz et al., 1996, Zhang et al., 1996a, 1996b, Pothuluri et al., 1998a, 1998b, Ambrósio e Campos –Takaki, 2004).

A identificação das variáveis associadas ao metabolismo de *C. elegans* frente à presença de agentes recalcitrantes, especificamente dibenzotiofeno, representa uma tecnologia alternativa para a minimização e/ou remoção completa de substâncias poluidoras, principalmente dos derivados de petróleo.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo geral analisar a habilidade do fungo *Cunninghamella elegans*, em metabolizar dibenzotiofeno, composto modelo para estudos de

biodessulfurização. Em paralelo, foram feitos estudos morfológicos, para avaliar, os comportamentos fisiológicos, morfológicos e ultraestruturais de *C. elegans* frente a diferentes concentrações de dibenzotiofeno. Portanto, o presente trabalho foi desenvolvido visando atender aos seguintes objetivos descritos na forma de artigos:

- § Investigar a degradação do Dibenzotiofeno – DBT e analisar os produtos de degradação gerados por *C. elegans* (UCP – 596);
- § Investigar a influência do Dibenzotiofeno na fisiologia, na morfologia e na distribuição dos filamentos de actina de *C. elegans* (UCP – 596);
- § Investigar o efeito do Dibenzotiofeno – DBT na ultraestrutura e citoquímica para catalase em *C. elegans* (UCP – 596).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Poluição Ambiental por Petróleo

O petróleo contém hidrocarbonetos, que variam de uma simples molécula, como metano, a moléculas com alto peso molecular. A maioria dessas moléculas é composta de carbono e hidrogênio, mas a maioria dos óleos contém uma pequena porcentagem de enxofre orgânico e traços de nitrogênio orgânico. Os diferentes componentes do petróleo são usualmente agrupados em frações, dependendo de suas propriedades físico-químicas. Os hidrocarbonetos componentes do petróleo podem ser divididos em quatro classes: saturados, aromáticos, asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas) (Leahy e Colwell, 1990, Xu et al., 2006).

A fração saturada compreende os n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicloalcanos (naftenos). A fração aromática correspondente aos compostos aromáticos é formada por um ou mais anéis benzênicos, arranjos de forma linear, angular ou em grupos. Tem sido demonstrado que os n-alcanos são mais facilmente degradáveis, seguidos por aromáticos leves, sendo que os compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como benzo(a)pireno e o criseno, contendo mais de 3 anéis benzênicos, são mais recalcitrantes ao ataque microbiano e, por isso, persistem por mais tempo no ambiente. Esses compostos surgem no meio ambiente, por processos naturais e também pela ação antropogênica (Leahy e Colwell, 1990, Sugiura et al., 1997).

A poluição por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em ecossistemas terrestres e aquáticos tem recebido considerável atenção, devido ao fato de serem considerados compostos carcinogênicos e/ou mutagênicos, apresentando, dessa forma, efeitos tóxicos para os seres vivos. Adicionalmente, a poluição atmosférica caracteriza-se basicamente pela presença de gases tóxicos e partículas sólidas no ar, as principais causas deste fenômeno são: a emissão de

resíduos pelas indústrias siderúrgicas, petroquímicas, de cimento, pela queima de carvão mineral e principalmente por derivados de petróleo, utilizados em usinas, em automóveis e ainda em sistemas de aquecimento doméstico, ocasionando o aparecimento de várias doenças, em especial no aparelho respiratório, como brônquite crônica, asma e câncer pulmonar podendo ser acumulados nas cadeias tróficas. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são classificados como poluentes tóxicos prioritários pela U.S. Environmental Protection Agency (Lijinsky et al., 1963, Keith e Telliard, 1979, Cerniglia, 1984, Cerniglia e Heitkamp, 1989, Valle, 1995, Alexander, 2002, Prince, 2002, Greenwood et al., 2002, Cara et al., 2006, Mohebbali et al., 2006).

Nos ecossistemas, a biodegradação de derivados de petróleo, por populações naturais de microrganismos, representa um dos mecanismos primários pelos quais os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. No entanto, seu desaparecimento pode ocorrer através de uma variedade de processos abióticos, como a lixiviação e a fotodegradação. Desse modo, o grau de biodegradação e mineralização de hidrocarbonetos contaminantes, pode ser influenciado tanto por fatores físicos e químicos, quanto por fatores biológicos. Variáveis, como temperatura, pH, tipo de solo e sedimento, aeração, concentração de nutrientes, umidade, tipo e distribuição dos microrganismos, adaptação microbiana ao hidrocarboneto e a disponibilidade do composto, afetam sua degradação (Cerniglia e Heitkamp, 1989, Morgan e Watkson, 1989, Leahy e Colwell, 1990, Atlas, 1991, Volkering et al., 1993, Liu et al., 1995, Mendonça, 2002).

A biorremediação, definida como a transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los inofensivos, pode envolver o emprego de microrganismos endógenos ou exógenos. De um modo geral, a biorremediação requer um mecanismo para estimular e manter a atividade microbiana. Normalmente, este mecanismo requer: acceptor de elétrons (oxigênio, nitrato); nutrientes (nitrogênio, fósforo); e uma fonte de energia (carbono). Os principais microrganismos

associados à degradação de hidrocarbonetos são as bactérias e os fungos. Os fungos filamentosos possuem algumas características que os determinam como bons degradadores. Devido ao seu crescimento micelial, os fungos ramificam-se rapidamente no substrato, degradando-o, através da excreção de enzimas extracelulares, disponibilizando, dessa forma, o acesso ao ataque bacteriano. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como por exemplo, em meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e água, o que favorece o seu desenvolvimento em detrimento de outros microrganismos (Bouchez et al., 1996, Bennett e Faison, 1997).

2.2. Compostos Organosulfurados

A proteção da atmosfera é uma questão ambiental que dominará as políticas comunitárias afetando esferas diversas como a energética e a dos transportes. As emissões de gases provocadas pelo setor dos transportes têm uma particular importância, pela demanda de combustíveis para transportes ter aumentado na maioria dos países durante as últimas duas décadas. Esta busca por combustíveis menos poluidores está relacionada à eficiência térmica e aos aspectos ambientais, que incluem os poluentes e emissões de gases que provocam o efeito estufa. O teor de enxofre nos combustíveis é uma preocupação ambiental porque o enxofre é convertido em SO_x durante a combustão, que contribui para formação da chuva ácida (Kopac, 1999, Yu et al., 2006, Xu et al., 2006). Nas grandes cidades, por exemplo, cerca de 40% da poluição do ar resultam da queima de gasolina e óleo diesel pelos veículos automotores, responsáveis pela emissão de monóxido e dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, dióxido de enxofre, derivados de hidrocarbonetos e chumbo (Lee et al., 2002, King e Li, 2006).

Os compostos orgânicos contendo enxofre estão geralmente presentes em quase todas as frações de destilação do petróleo. De acordo com Song e Ma, 2003, existem três tipos principais

de combustíveis de transporte que apresentam diferentes composições e propriedades: gasolina (nafta, mercaptanas, sulfetos, dissulfetos, tiofeno e benzotiofeno), querosene de aviação (nafta pesada e benzotiofeno) e o óleo diesel (benzotiofenos e dibenzotiofeno). As estruturas moleculares de alguns destes compostos contendo enxofre, presentes nos combustíveis derivados do petróleo, estão listados a seguir (Figura 1).

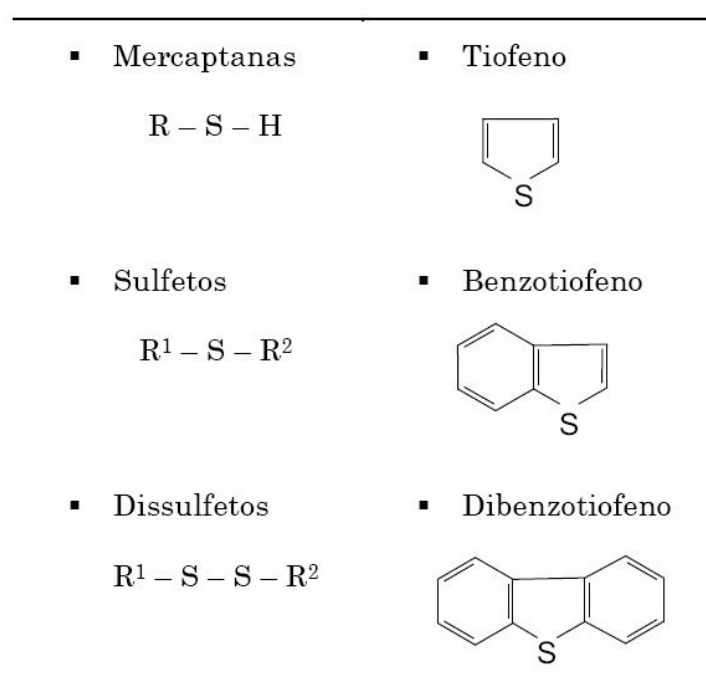


Figura 1. Estrutura molecular de alguns compostos orgânicos contendo enxofre. Fonte: Song e Ma, 2003.

Os compostos orgânicos contendo enxofre (S) constituem uma pequena, mas importante fração destes combustíveis, e devido a sua difícil biodegradabilidade são considerados compostos recalcitrantes. A presença do elemento enxofre é indesejável por contribuir para a corrosão de equipamentos em refinarias, e também pela emissão de óxidos de enxofre (SOx) para a atmosfera, através da combustão de combustíveis fósseis. Conseqüentemente, causam problemas ambientais, como poluição do ar e é o potencial causador de chuvas ácidas (Song e Ma, 2003). O

dibenzotiofeno é considerado um composto modelo para estudos de dessulfurização biológica de combustíveis fósseis e em estudos de compostos S-heterocíclicos persistentes no ambiente (Yamada et al., 1968, Spies et al., 1987, Li et al., 2003, Yu et al., 2006). Vários microrganismos têm sido estudados para remoção bioquímica de enxofre do DBT (Van Afferden et al., 1990, Faison et al., 1991, Kilbane, 1991, Kilbane e Jackowski, 1992, Omori et al., 1992, Jia et al., 2006, Mohebbali et al., 2006, Yu et al., 2006, Gai et al., 2007).

2.2.1. Métodos de Remoção do Enxofre

Uma das estratégias para diminuir as emissões de gases poluentes, consiste na remoção do enxofre do carvão, do petróleo e de seus derivados antes da sua combustão (Lee et al., 2002, Cara et al., 2006, King e Li, 2006, Li et al., 2007). Atualmente, nas refinarias de petróleo tem sido utilizado, para a remoção de enxofre inorgânico, processo físico - químico, conhecido como hidrodessulfurização (HDS). Tal tratamento tem custos muito elevados, envolvendo catalisadores químicos sob condições extremas de temperaturas (200 a 425°C) e altas pressões 150 a 205psi (Izumi et al., 1994). Além disso, o enxofre associado a compostos orgânicos é bastante difícil de ser removido, já que se encontra ligado covalentemente a matrizes orgânicas (Denome et al., 1994). O enxofre inorgânico e o enxofre orgânico simples podem ser removidos pelo processo de HDS, mas este processo é inadequado para produção de combustíveis com baixo teor de enxofre e é incapaz de remover compostos policíclicos contendo enxofre, presente no petróleo e no carvão mineral. Compostos tiofênicos permanecem em grande quantidade após o tratamento de HDS nos combustíveis. A dessulfurização de DBT tem sido um modelo de reações no tratamento de combustíveis fósseis. No entanto, outra estratégia para reduzir o conteúdo de enxofre é expor estes substratos a microrganismos que podem quebrar especificamente a cadeia carbono-enxofre,

liberando o enxofre na porção solúvel-água, forma inorgânica. Este processo de dessulfurização microbiana ou biodessulfurização (BDS) é eficaz e econômico (Monticello, 2000).

Várias bactérias anaeróbias são capazes de oxidar seletivamente o enxofre do DBT sem degradar o esqueleto de carbono da molécula. O principal avanço desta reação é a remoção seletiva do átomo de enxofre, conservando assim, o valor energético do hidrocarboneto (Abbad-Andaloussi et al., 2003). Contudo, há poucos relatos na literatura sobre conversão específica de tiofenos por microrganismos aeróbicos (Kim et al., 1990a, 1990b, Folson et al., 1999, Grossman et al., 1999, Kobayashi et al., 2001, Hirasawa et al., 2001).

Organismos procarióticos, que dessulfurizam compostos organosulfurados, sem metabolizar o esqueleto de carbono, são pouco comuns e geralmente são utilizadas em vias de oxidação seletiva de enxofre (Monticello et al., 1985, Monticello e Finnerty, 1985, Crawford e Gupta, 1990, Lee et al., 1995, Grossman, 1999). Por outro lado, organismos eucarióticos como: o fungo *Cunninghamella elegans* cresce em DBT, formando DBT-5-óxido e DBT-5-dióxido, mas não há formação de bifênil (Crawford e Gupta, 1990). O fungo *Paecylomyces sp.* remove especificamente o enxofre através da oxidação do DBT e tem como produto final da degradação 2-2'-dihidroxibifenil (Faison et al., 1991). Não há relatos de crescimento de leveduras em DBT e/ou compostos tiofênicos que normalmente ocorrem na indústria de combustíveis. A dessulfurização bioquímica normalmente envolve uma série de reações S-oxigenação de enxofre em compostos tiofênicos com enxofre (Kilbane, 1990). A oxidação biológica de enxofre é primeiramente catalisada por dois sistemas enzimáticos, P450 monooxigenases e monooxigenases contendo flavina (FMO). Contudo, na maioria dos microrganismos, as enzimas responsáveis pela oxigenação do enxofre (S-oxigenação), não têm sido claramente identificadas. *Cunninghamella elegans* catalisa o S-oxigenação de DBT (Crawford e Gupta, 1990).

2.2.2. Vias Metabólicas Degradativas do Dibenzotiofeno

Em 1973 Kodama e seus colaboradores estudaram duas espécies de *Pseudomonas spp.* Os autores constataram que o DBT era parcialmente degradado através de sucessivas oxidações por um mecanismo semelhante ao da degradação do naftaleno (Denome et al., 1993). Esta é a via utilizada pela maioria das bactérias estudadas que atacam o DBT (Kilbane e Jackowsky, 1992). O ataque ao anel benzênico ocorre nas posições 2 e 3 do DBT (Gallagher et al., 1993). Como, geralmente, os compostos análogos ao DBT presentes nos combustíveis fósseis têm substituintes alquilo ou arilo nessas posições, estes compostos não podem ser degradados por esta via. Por outro lado, o produto final da degradação parcial do DBT, ainda, contém o átomo de enxofre, apresentando níveis de toxicidade biológica semelhantes ao substrato inicial (Gallagher et al., 1993) (Figura 2).

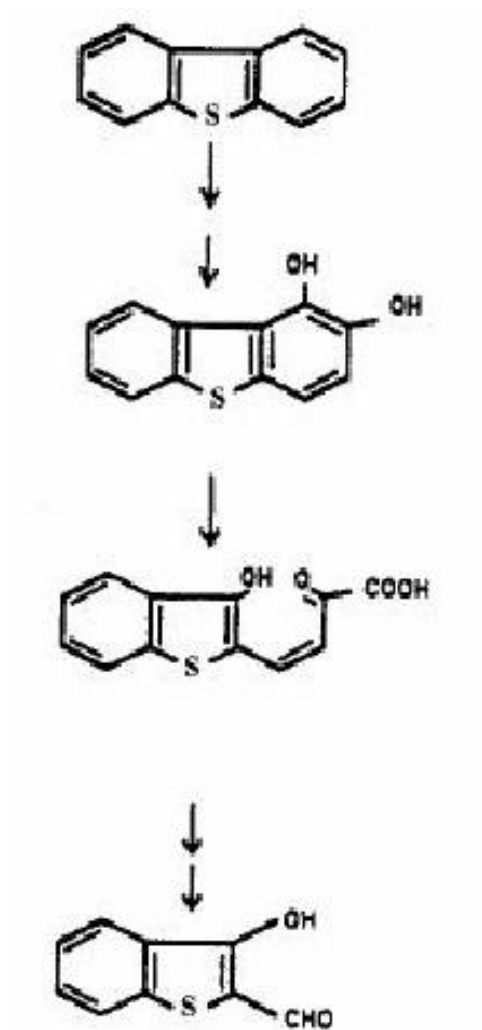


Figura 2. Via degradativa do dibenzotiofeno. Via de Kodama; o átomo de enxofre não é removido, havendo ruptura de ligações C-C (Kilbane e Jackowsky, 1992).

Em 1990, Van Afferden propos uma via metabólica diferente, via dioxigenação angular, onde o DBT é convertido, em quantidades estequiométricas, a ácido benzóico e sulfito que por sua vez é oxidado a sulfato, por oxidação abiótica. O benzoato é, por sua vez, totalmente mineralizado a CO_2 e H_2O . Deste modo, o DBT é usado como nutriente pelos microrganismos no papel duplo, de fonte de carbono e de enxofre. Esta via de degradação do DBT, não tem grande interesse em termos de processos de biodessulfurização de combustíveis fósseis, já que a mineralização completa da estrutura carbonada implicará necessariamente na diminuição do potencial energético químico do combustível. Porém, bactérias que participam desta via metabólica são potencialmente úteis na formulação de inóculos microbianos mistos para processos de biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos contendo enxofre, liberados no ambiente (Figura 3).

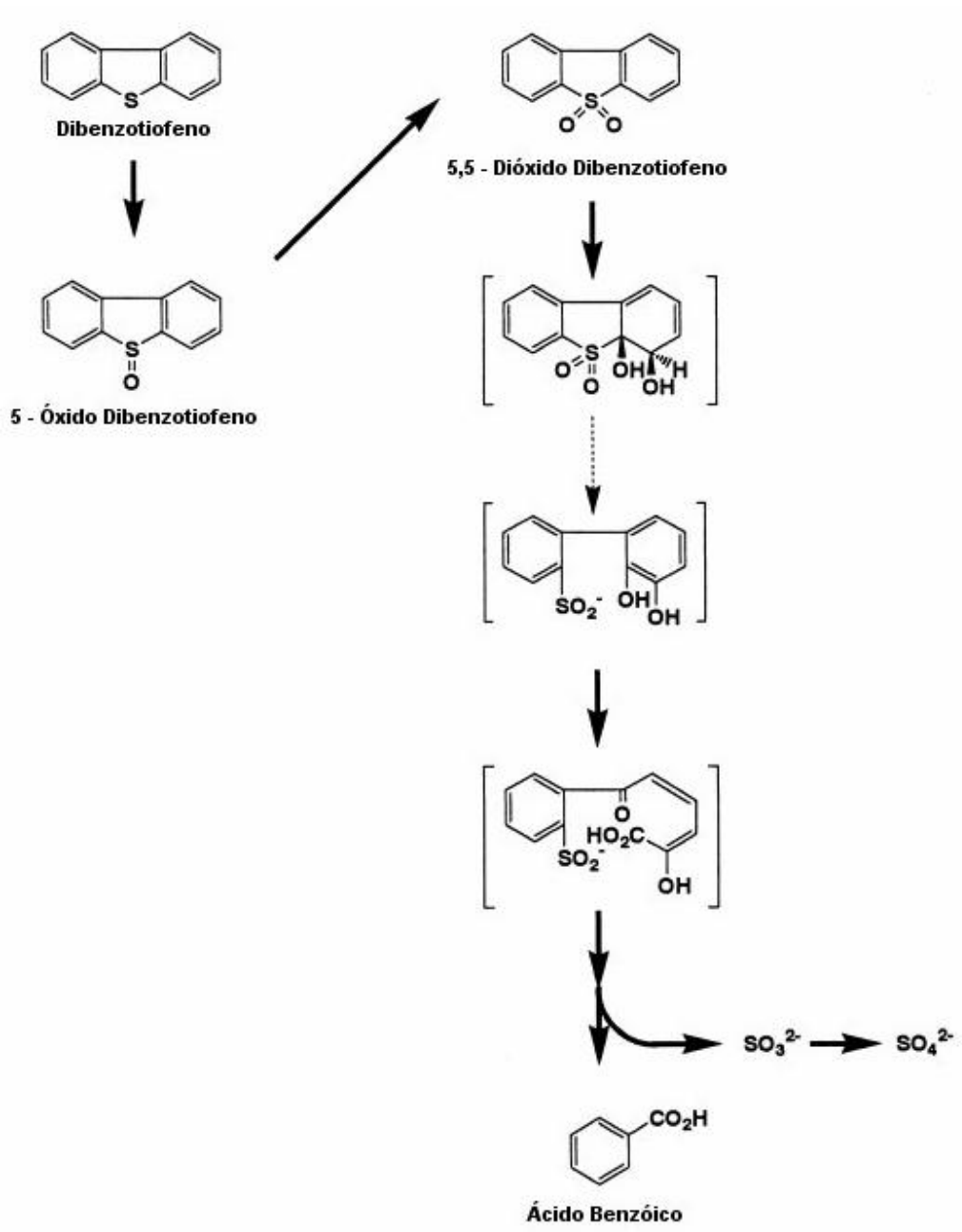


Figura 3. Via degradativa do dibenzotiofeno. Via de Van Afferden ou Via Dioxigenação Angular; o enxofre é removido na forma de íon sulfito ocorrendo a ruptura da estrutura carbonada e o produto final formado é o Ácido Benzóico (Van Afferden *et al.*, 1990, Nojiri *et al.*, 2001).

A via sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato denominada “4S” é específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT, através de um ataque oxidativo progressivo no grupo tiofênico. A partir de estudos em *Rhodococcus sp. IGTS8*, foi demonstrado que esta via envolve um sistema multienzimático com três atividades diferentes (Kilbane e Jackowski, 1992). A primeira enzima é uma monooxigenase do DBT, que oxida o DBT a 5,5'-dióxido de DBT, a segunda enzima é igualmente uma monooxigenase que converte o 5,5'-dióxido de DBT a 2'-hidroxibifenil-2-sulfinato, e finalmente uma liase que catalisa a quebra da ligação C-S transformando o 2'-hidroxibifenil-2-sulfinato em dois produtos finais, 2'-hidroxibifenil (HBP) e sulfato. Os microrganismos que utilizam esta via conseguem retirar o átomo potencialmente tóxico do composto tiofênico, sob a forma de um composto sulfato, apenas ocorrendo uma ligeira perda do seu valor energético. Deste modo, as estirpes utilizadoras da via “4S” podem constituir uma ferramenta biológica fundamental no tratamento em larga escala de combustíveis fósseis, caso biocatalisadores sejam inseridos no ambiente industrial (Wang e Krawiec, 1994) Figura 4.

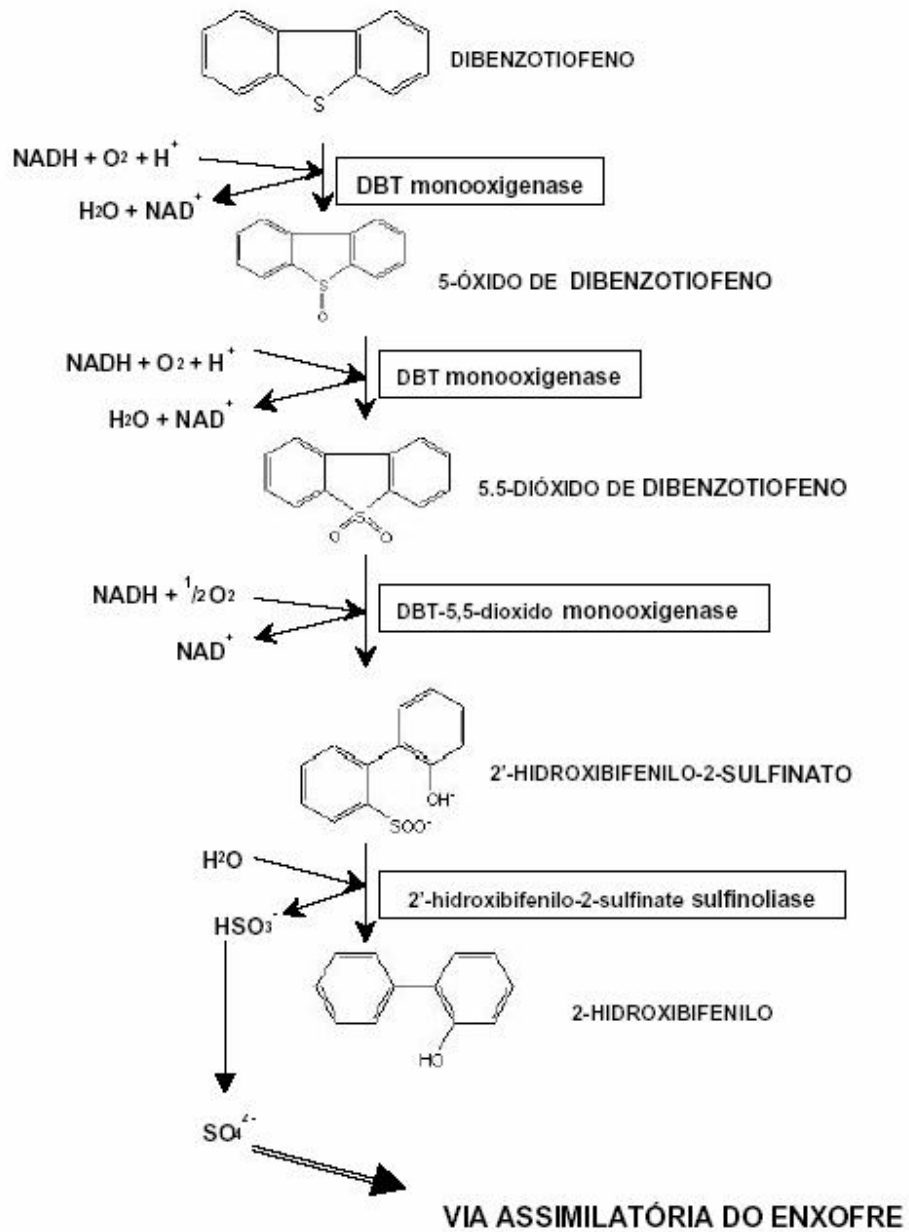


Figura 4. Via degradativa do dibenzotiofeno. Via “4S”; o enxofre é removido na forma de sulfito, permanecendo intacta a estrutura carbonada (Gallagher *et al.*, 1993).

2.3. Fungos: Classe Zygomycetes

Os Zygomycetes possuem hábitos sapróbios, simbiontes e parasitas de plantas, animais e de outros fungos (Alexopoulos et al., 1996). Devido as suas características como fungos sapróbios, exibem crescimento em temperaturas que variam de 25°C a 42°C, de acordo com a espécie, como também versatilidade em relação às condições de aeração e produção de enzimas (Orlowsk, 1991, Griffin, 1994, Weitzman et al., 1995). A reprodução dos Zygomycetes ocorre através de esporos de origem sexuada e assexuada. Os esporos de origem assexuada ou aplanósporos se originam em estruturas reprodutivas, esporângio ou por diferenciação da hifa em clamidósporo e artrósporo. Os esporos de origem sexuada ou zigósporos, formados a partir da união de hifas diferenciadas em gametângios femininos e masculinos, os quais se fundem ocorrendo cariogamia Dube, 1978 . Devido a sua participação nos processos de biodeterioração atacando materiais de diversas origens como couro, plásticos, madeira e alimento, podem ser úteis principalmente na reciclagem de lixo, formação de adubo industrial, produção de enzimas, ácidos graxos, antibióticos, conservantes e ácidos lácticos (Dube, 1978, Tombs e Blake, 1982, Endo et al., 1985, Osmani e Scrutton, 1985, Trudel e Asselin, 1990, Brown et al., 1993, Certik et al., 1997). Sendo assim, os Zygomycetes são organismos com grande potencial econômico-industrial, apresentando habilidade de adaptação a diferentes condições ambientais, como resposta a variações em suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representam elementos fundamentais na compreensão de seu comportamento celular, com vista à identificação de mecanismos específicos de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência (Griffin, 1994, Carlile e Watkinson, 1996).

2.3.1. Gênero *Cunninghamella*

Os representantes exibem colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangíolos. O micélio quando jovem não exibe septo. A septação está associada à idade da cultura (Baijal e Mehrotra, 1980, Domsch et al., 1980). Os esporos podem ser globosos ou ovais com paredes lisas ou com espículas, geralmente unicelulares. As espécies podem formar zigósporos globosos, escuros e tuberculados que são formados entre células suspensoras, geralmente heterotáticas. Clamidósporos podem ocasionalmente ser formado (Domsch et al., 1980). Do ponto de vista taxonômico, espécies de *Cunninghamella* podem ser identificadas por sua habilidade em responder a variações no meio de cultivo. Contudo, a separação das espécies é complexa e alguns estudos foram realizados para identificar caracteres de valor taxonômico como, por exemplo, a forma do esporangíolo analisada por microscopia óptica (O'Donnel, 1979, Shipton e Lunn, 1980, Alexopoulos et al., 1996, Carlile e Watkinson, 1996). No campo biotecnológico, a espécie de *C. bainieri* tem a capacidade de metabolizar xenobióticos, incluindo compostos aromáticos, drogas farmacológicas e ainda na bioabsorção de metais pesados. O fungo *C. elegans* tem habilidade de oxidar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos de petróleo. Alguns trabalhos de pesquisa relatam a capacidade do fungo *C. elegans* metabolizar o organosulfurado dibenzotiofeno - DBT (Ferris et al., 1973, Cerniglia e Gibson, 1977, Jones et al., 1989, Donald et al., 1990, Zhang, 1996, Zhang et al., 1996a, 1996b).

2.4. Citoesqueleto de Actina

A adaptação celular às condições ambientais adversas é um processo biológico fundamental que protege os organismos contra efeitos letais (Park et al., 1996). Muitos estudos têm demonstrado a adaptação dos fungos às condições de estresse ambiental, incluindo efeitos da temperatura (McAlister e Finkelstein, 1980, Farber e Brown, 1990), da salinidade (Edgley e Brown, 1983, Beever e Laracy, 1986, Park et al., 1996), bem como, na degradação de derivados de petróleo, como: compostos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos contendo enxofre (Cerniglia et al., 1979, Cerniglia e Heitkamp, 1989, Crawford et al., 1990). É primordial estudo acerca da adaptação dos fungos em situação de estresse ambiental, tendo em vista que diversos microrganismos produzem metabólitos secundários de considerável valor biotecnológico (Radwan et al., 2002).

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 ergosterol (Griffin, 1994, Carlile e Watkinson, 1996).

Os fungos filamentosos 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 mediador 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).

Na microscopia óptica a utilização da faloidina, proteína que tem alta afinidade pela actina, complexada ao isotiocianato de fluoresceína, permite a observação do filamento de actina "*in situ*". Os elementos do citoesqueleto podem estar envolvidos na motilidade de organelas ou atuam direcionando o movimento de vesículas (Carlile e Watkinson, 1996).

Em fungos, nos estudos sobre citoesqueleto por microscopia óptica utilizando a faloidina, tem possibilitado a observação dos filamentos de actina *in situ*. Os elementos do citoesqueleto podem estar envolvidos na motilidade das organelas ou atuam direcionando o movimento de vesículas (Carlile e Watkinson, 1996). A associação de actina a parede celular sob formas diversificadas, está relacionada a sítios de formação e extensão da parede celular, o que sugere seu envolvimento nos processos de modificação e síntese da própria parede (Heath, 1990).

O crescimento de um organismo é um processo complexo e altamente coordenado, o qual envolve muitos componentes celulares que acompanham o desenvolvimento e diferenciações celulares. Embora, proteínas, ácidos nucléicos, açúcar, lipídeos e fosfatos sejam constituintes biológicos básicos de todos os organismos vivos, sua composição, localização e estrutura podem variar gerando moléculas altamente diferenciadas em organismos distintos (Garraway e Evans, 1984, Griffin, 1994).

2.5. Ultraestrutura

Desde o desenvolvimento da microscopia eletrônica (1931) como método de estudo de células, uma série de metodologias, como por exemplo, a microscopia eletrônica de varredura, microanálise por raios-X, criopreservação e técnicas imunológicas foram aperfeiçoadas. A rápida

evolução do surgimento de microscópios mais modernos, como o de transmissão de alta resolução e o de varredura, permite, atualmente, inclusive, o estudo de amostras frescas e o mínimo de manipulação possível durante o processamento (Klomprens, 1990, Collins et al., 1993).

A célula fúngica é caracterizada, citologicamente, através da microscopia óptica. Contudo, a introdução da microscopia eletrônica na década de 60 para análise estrutural de fungos gerou uma nova visão sobre esse tipo celular. A partir da década de 60, a bioquímica, juntamente, com a microscopia eletrônica, promoveram um conhecimento mais acurado sobre a composição química e sua influência na determinação da morfologia da parede celular (Bartnicki-Garcia, 1968). Aspectos da esporangiosporogênese, morfologia e germinação de esporos de espécies de *Rhizopus*, *Mucor rouxii*, *Gilbertella persicaria* e *Mycotypha* também foram estudados (Hawker e Abbott, 1963, Bartinicki-Garcia et al., 1968, Bracker, 1968, Young, 1969).

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

A citoquímica ultraestrutural gera informações sobre a localização *in situ* de moléculas, permitindo a associação entre as diferentes atividades bioquímicas de qualquer tipo celular. Os resultados obtidos com a citoquímica combinados com dados obtidos por outras metodologias conduzem a elucidação das funções, atividades e estado metabólico de diferentes compartimentos celulares (De Souza, 1989, Alberts et al., 1996). A evidenciação dos sítios ou moléculas, aos quais se aplica determinada citoquímica, torna-se possível através de reações químicas que levam

a mudanças de eletrondensidade por precipitação, ou pela utilização de marcadores eletrondensos como ouro coloidal e ferritina (Danon et al., 1972, Roth, 1983, Geoghegan, 1988).

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

Os primeiros relatos obtidos com técnicas citoquímicas aplicadas a fungos datam no final da década de 50, onde (Ebel et al., 1958) relatam a presença de corpos densos observados em microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão, em espécies de *Aspergillus*. A partir de então, técnicas citoquímicas desenvolvidas para tecidos e células animais passaram a ser utilizada em fungos (Vorisek e Pokorny, 1975), revelando a presença de polissacarídeos na superfície de complexos membranosos em fungos, como a membrana plasmática, vacúolos, retículos endoplasmáticos, vesículas, realizando a marcação, realizando a marcação na pré-embrição, em Ascomycetes *Claviceps purpurea* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Os fungos, de um modo geral, são extremamente versáteis em suas respostas em função de variações ambientais. Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação, e microelementos influenciam o metabolismo, o crescimento celular, a diferenciação, a formação de estruturas reprodutivas e diferenciação sexual (Garraway e Evans, 1984, Griffin, 1994, Aoki e Nirenberg, 1999, Kanauchi e Kukatsui, 1999, Kihara et al., 1999, Kitamoto et al., 1999, Tham et al., 1999).

Dessa forma, estudos que melhorem o conhecimento e a compreensão acerca do comportamento de microrganismos em resposta ao composto organosulfurado, dibenotiofeno são fundamentais para o desenvolvimento das pesquisas em biorremediação.

Referências

- Abbad-Andaloussi, S., Warzywoda, M. e Monot, F., 2003. Microbial Desulfurization of Diesel Oils by Selected Bacterial Strains. *Oil e Gas Science and Technology*. Ver. IFP. 58 (4), 505 – 513.
- Akashi, T., Kanbe, T., Tanaka, K., 1993. The Role of Cytoskeleton in the Polarized Growth of the Germ Tube in *Candida albicans*. *Microbiology*. 140, 271 - 280.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., 1996. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishers, p. 1294.
- Alexander, R. R., Tang, J. X. and Alexander, M., 2002. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. *J. Environ. Qual.*, 31, 150 - 154.
- Alexopoulos, C.J, Mims, C.W, Blackwell, M., 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley e Sons publishers.
- Ambrósio, S. T. E., Campos Takaki, G. M., 2004. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* (UCP-542) under co-metabolic conditions. *Bioresource Technol.*, 91, 69 – 75.

- Aoki, J. e Nireuberj H. I., 1999. *Fusarium globosum* from Subtropical Japan and the Effect of Different Light Conditions on its Conideogenesis. *Mycoscience*. Tóquio, 40, 1 - 9.
- Atlas, R. M., 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Oil Spills. *J. Chem. Techn. Biotech.*, 52, 149 - 156.
- Atlas, R.M. e Bartha, R., 1992. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 3 ed., The Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc., CA, USA. p. 563.
- Baijal, U., Mehrotra, B. S., 1980. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. *Sydowia*. 33, 1 - 13.
- Baik, W. Y, Bae, J. H, Cho, K. M, Hartmeier, W., 2002. *Bioresource Technol.*, 81, 167 - 170.
- Barkai-Golan, R., Mirelman, D., Sharon, N., 1978. Studies on Growth Inhibition by Lectins of *Penicillium and Aspergilli*. *Arch. Microbiol.*, 116, 119 - 124.
- Bartnicki-Garcia, S., Nelson N., Cota Robles, E., 1968. Electron Microscopy of Spore Germination and Cell Wall Formation in *Mucor rouxii*. *Arch. Microbiol.*, 63, 242 - 255.
- Beever, R. E. e Laracy, E. P., 1986. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol.* 1986 December; 168(3), 1358 – 1365.

- Bennett, J.W.; Faison, B.D., 1997. Use of fungi in Biodegradation. In: Manual of Environmental Microbiology, Ed. Chridton J. Hurst, J. ASM Press, Washington D. C., USA, 758 - 765.
- Berbee, M. L. e Kerwin, M., 1993. Ultrastructure and Light Microscopic Localization of Carbohydrates and Peroxidase/Catalase in *Langenidium giganteum* Zoospores. *Mycologia*. 85, 734 - 743.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F., Vandecasteele, J. P., 1996. “Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l’environnement”, *Revue de l’Institut français du pétrole*, 51 (6), 794 - 828.
- Bracker, C. E., 1968. The Ultrastructure and Development of Sporangia in *Gilberteria persicaria*. *Mycologia*. 60, 1016 – 1067.
- Brown, E. D., Yada, R. Y., Marangon, A. G., 1993. The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in aerosol – OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Bioch. Bioph. Acta*. 1161, 66 - 72.
- Cara, J., Vargas, M., Morán A., Gómez, E., Martinez, O., García Frutos, F. J., 2006. BIODESULPHURIZATION OF A COAL BY PACKED-COLUMN LEACHING. Simultaneous thermogravimetric and mass spectrometric analyses. *Fuel*. 85, 1756 – 1762.
- Carlile, M. J. e Watkinson, S. C., 1996. *The Fungi*. 3rd Edition. Academic Press Ltd. Londres. p. 482.

- Cerniglia, C. E. e Gibson, D. T., 1977. Metabolism of naphthalene of *Cunninghamella elegans*.
Appl. Environ. Microbiol., 34, 363 - 370.
- Cerniglia, C. E. and Gibson, D. T., 1979. Oxidation of benzo(a)pyrene by the filamentous fungus
Cunninghamella elegans. *J. Biol. Chem.* 254, 12174 - 12180.
- Cerniglia, C. E., 1984. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Adv. Appl.*
Microbiol., 30, 31 - 69.
- Cerniglia, C. E.; Heitkamp, M. A., 1989. Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic
Hydrocarbons (PHA) in the Aquatic Environment. In: VARANASI, U., ed. *Metabolism of*
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Boca Raton: CRC Press,
41 - 68.
- Cerniglia, C. E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opi.*
Biotechn., 4, 331 - 338.
- Certik, M., Balteszola, L., Sajbiro, J., 1997. Lipid formation and α -linolenic acid production by
Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Lett. App. Microbiol.*, 25, 101 - 105.
- Cervantes e Gutierrez-Corana, 1994. Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi.
Microbiol. Rev. 14, 121 - 138.

- Collins, S. P., Pope, R. K., Scheetz, R. W., Ray, R. I., Wagner, P. A. e Little, B. J. , 1993. Advantages of Enviromental Scanning Electron Microscopy in Studie of Microorganisms. *Microsc. Res. Tech.*, 25, 398 - 405.
- Corseuil, H.X., Alvarez, P.J.J., 1996. Natural Bioremediation Perspective for BTEX-Contamineted Groundwater in Brazil. *Rev. Microbiol. S. Paulo*, 27 (1), 43 - 50.
- Crawford, D. e Gupta, R. K., 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr. Microbiol.*, 21, 229 - 231.
- Czymmek, K. J., Bourettt, T. M., Howrad, R. J., 1995. Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrilate de-embedment. *J. Microscopy*, 181, 153 - 161.
- Danon, D., Goldstein, L., Marikovsky, Y., Skutelsky, E., 1972. Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. *J Ultrastruct Res.* 38(5), 500 - 10.
- De Souza, W., 1989. Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro, p. 134
- Denome, S. A, Olson, E. S., Young, K. D., 1993. Identification and Cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus sp.* strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2837 - 2843.

- Denome, S. A., Oldfield, C., Nash, L. J., Young, K. D., 1994. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *J. Bacteriology*, 176, 6706 - 6716.
- Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H., 1980. *Compendium of soil fungi*, Academic Press., 1, 120.
- Donald, L., Crawford e Rajinder, K. Gupta, 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr. Microbiol.*, 21, 229 – 231.
- Dube, H. C., 1978. *A Textbook of Fungi, Bacteria and Viruses*. Vikas Publishing House Put Ltd., p. 239.
- Ebbel, J. P., Colas, J. et Muller, S., 1958. II Mise au point de methods de detection cytochimiques spécifiques des polyphosphates. *Exp. Cell Res.*, 15, 28 - 36.
- Edgley, M. e Brown, A. D., 1983. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. gen. microbiol.*, 129 (11), 3453 - 3463.
- Endo, A.; Takeshima, H. e Kuwabara, K., 1985. Acetil CoA Carboxylase Inhibitors From the Fungus *Gongronella butleri*. *The Journal of Antibiotics*, XXXVIII, 599 – 604.

- Faison, B. D., Clark, T. M., Lewis, S. N., Ma, C. Y., Sharkey, D. M. e Woodwr, C. A., 1991. Degradation of Organic sulfur compounds by a coal-solubilizing fungus. *App. Bioch. Biotechn.*, 28/29, 237 – 250.
- Farber, J. M. and Brown, B. E., 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl Environ Microbiol.* 56(6), 1584 - 1587.
- Ferris, J. P., Fasco, M. J., Stylianopoulou, F. L., Jerina, D. M., Daly, J. W., Jeffery, A. M., 1973. Monooxygenases activity in *Cunninghamella bainieri*. Evidence for a fungal system similar to liver microsomes. *Arch. Biochem. Bioph.*, 156, 97 – 103.
- Folsom, B. R., Schieche, D. R., Digrazia, P. M., Werner, P., Palmer, S., 1999. Microbial Desulfurization of Alkylated Dibenzothiophenes from a Hydrodesulfurized Middle Distillate by *Rhodococcus erythropolis* I19. *App. Environ. Microbiol.*, 65, 4967 - 4972
- Foster, B. C., Lister, D. L., Zamecnik, J., Coutts, R. T., 1991. - The biotransformation of tranlycypromine by *Cunninghamella equinulata*. *Can. J. Microbiol.*, 37, 791 – 795.
- Gai, Z., Yu, B., Li, L., Wang, Y., Ma, C Feng, J., Deng, Z. e Xu, P., 2007. Cometabolic Degradation of Dibenzofuran and Dibenzothiophene by a Newly Isolated Carbazole-Degrading *Sphingomonas* sp. Strain. *App. Environ. Microbiol.*, 73(9), 2832 – 2838.
- Gallagher, J. R., Olson, E. S., Stanley, D. C., 1993. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107, 31 – 36.

Garraway, M.O e Evans, R. C., 1984. Fungal Nutrition and Physiology. John Willey e Sons Incorporation publishers. p. 401.

Geoghegan, W. D., 1988. Immunoassays at the microscopic level: solid-phase colloidal gold methods. J. Clin. Immun., 11, 11 - 23.

Greenwood, G., Kidd, D., Gislason, J., Slater, P., 2002. Sulfur Removal from Gasoline and Diesel: Reaching Low levels Without Sacrificing Fuel Quality or Quantity. 17th World Petroleum Congress, RJ-Brazil: CD-ROM.

Griffin, D. H., 1994. Fungal Physiology. John Willey e Sons Incorporation Publishers. p. 458.

Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garrett, K. K., George, G. N., Pickering, I. J., 1999. Microbial Desulfurization of a Crude Oil Middle-Distillate fraction: Analysis of the Extent of Sulfur Removal and the Effect of Removal on Remaining Sulfur. App. Environ. Microbiol., 65, 181 - 188.

Hawker, L. E. e Abbott, P. Mcv., 1963. An Electron Microscope Study of Maturation and Germination of Sporangiospores of Two Species of *Rhizopus*. J. Gen. Microbiol., 32, 295 - 298.

Heath, I. B., 1990. The roles of actin in tip growth of fungi. Int. Rev. Cytol., 123, 95 - 127

Herrera, T., Ulloa, M., 1998. El Reino de los Hongos micología básica y Aplicada (2ª ed.).

- Hirasawa, K., Ishii, Y., Kobayashi, M., Koizumi, K., Maruhashi, K., 2001. Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. *Biosc. Biotechn. Biochem.*, 65, 239 - 246
- Izumi, Y., Ogino, T. O., Hine, Y. e Shimao, M., 1994. Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (1), 223 - 226.
- Jia, X., Wen, J., Sun, Z., Caiyin, Q., Xie, S., 2006. Modeling of DBT biodegradation behaviors by resting cells of *Gordonia* sp. WQ-01 and its mutant in oil–water dispersions. *Chem. Eng. Sci.*, 61, 1987 – 2000.
- Jones, J. K., Stratfort, J. A., Watherhouse, K. S., Vogt, N. B., 1989. Organic contaminants in welsh soils: polyinuclear aromatics hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 540 – 550.
- Kana-Uchi, A. e Kukatsui, T., 1999. Light Induced Fruit Body Formation of Entomogenous Fungus *Paecilomyces termipes*. *Mycoscience*. 40, 349 – 351.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technol., Inglaterra*. 53, 195 – 206.
- Keith, L. H.; Telliard, W. A. Priority Pollutants I., 1979. A Perspective View. *Environ. Sci. Technol.*, 13, 416 - 423.

- Kihara, J., Watanabe, Y., Honda, Y., 1999. Suppression and Reactivation of UV-Induced Sporulation by Blue Light in *Bipolaris oryzae*. *Mycoscience*, 40, 363 – 366.
- Kilbane, Ii, J. J., 1990. Sulfur specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources, Conservation and Recycling*. 3, 69 – 79.
- Kilbane, Ii, J. J., 1991. Microbiol removal of organic sulfur from coal: current status and research needs. In: *Bioprocessing and Biotreatment of coal*, edited by D.L., Wise (New York: Marcel Decker), 487 - 505.
- Kilbane, Ii, J. J. e Jackowski, K., 1992. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechn. Bioengin.*, 40, 1107 – 1114.
- Kim, H. Y., Kim, T. S., Kim, B. H., 1990a. Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* M6. *Biotechn. Lett.*, 12, 761 – 764.
- Kim, T. S., Kim, H. Y., Kim, B. H., 1990b. Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied equivalent. *Biotechn. Lett.*, 12, 757 – 760.
- King, D. L. e Li, L., 2006. Removal of Sulfur Components from Low Sulfur Gasoline Using Copper Exchanged Zeolite Y at Ambient Temperature. *Catal. Today*. 116, 526 – 529.

- Kitamoto, Y., Akita, K., Horikoshi, T., 1999. Effects of High-Temperature Treatment on Two Essential Light Processes and an Intervening Dark Process in Photoinduced *Pileus* Primordium Formation of a Basidiomycete, *Favolus arcularius*. *Mycoscience*. Tókió. 40, 103 - 108.
- Klomprens, K. L., 1990. The Development and Application of Ultrastructural Research in Mycology. *Mycopathologia*. 109, 139 – 148.
- Kobayashi, M., Horiuchi, K., Yoshikawa, O., Hirasawa, K., Ishii, Y., Fujino, K., Sugiyama, H., Maruhashi, K., 2001. Kinetic analysis of microbial desulfurization of model and light gas oil containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosc. Biothec. Biochem.*, 65, 298 - 304.
- Kodama, K., Umehara, K., Shimizu, K., Nakatani, S., Minoda, Y., Yamada, K., 1973. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 45 – 50.
- Kopac, T., 1999. Non-isobaric adsorption analysis of SO₂ on molecular sieve 13X and activated carbon by dynamic technique. *Chem. Eng. Proc.* 38, 45 – 53.
- Leahy, J. G.; Colwell, R. R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environ. *Microbiol. Rev.*, 54, 305 - 315.

- Lee, M. K., Senius, J. D., e Grossman, M. J., 1995. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4362 - 4366.
- Lee, S. H. D., Kumar, R., Krumpelt, M., 2002. Sulfur removal from diesel fuel contaminated methanol. *Sep. Purif. Tech.*, 26, 247 – 258.
- Li, F., Zhang, Z., Feng, J., Cai, X., Xu, P., 2007. Biodesulfurization of DBT in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. *J. Biotechnol.*, 127, 222 – 228.
- Li, L. F., Xu, P., Ma, C. Q., Luo, L. L., Wang, X. S., 2003. Deep Desulfurization of Hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium sp.* X7B. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223, 301 – 307.
- Lijinsk, W.; Domsky, I.; Mason, G.; Ramahi, H. Y.; Safavi, T., 1963. The Chromatographic determination of Trace Amounts of Polynuclear Hydrocarbons in Petrolatum, Mineral Oil, and Coal Tar. *Anal. Chem.*, 35, 952 - 956.
- Liu, Z.; Jacobson, A. M.; Luthy, R.G. 1995. Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1), 145 - 151.
- Mahony, T. O., Guibal, E., Tobin, J. M., 2002. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enz. Microb. Technol.*, 31, 456 – 463.

- McAlister, L. e Finkelstein, D. B., 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 819 - 824.
- Mendonça, E. and Picado, A., 2002. Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven soil. *Environ. Toxicol.* 17, 74 - 79.
- Mohebbi, G., Ball, A. S., Rasekh, B. e Kaytash, A., 2006. Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Enz. Microb. Technol.*, 1 – 7.
- Monticello, D. J. e Finnerty, W. R., 1985. Microbial desulfurization of fossil fuel. *Annual Rev. Microbiol.*, 39, 371 - 389
- Monticello, D. J., Bakker, D., Finnerty, W. R., 1985. Plasmid-Mediated degradation of dibenzothiophene by a *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 756 - 760.
- Monticello, D. J., 2000. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 540 – 546.
- Morgan, P.; Watkinson, R. J. 1989. Hydrocarbon Degradation in Soils and Methods for Soil Biotreatment. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 8, 305 - 333.
- Nojiri, H., Habe, H. e Omori, T., 2001. Bacterial degradation of aromatic compounds via angular dioxygenation. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 279 – 305.

- O'Donnel, K. L., 1979. *Zygomycetes in culture*. University of Georgia. v. 257.
- Oliveira, F. J. S., 2001. "Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru". Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, p. 110.
- Omorí, T., Monna, L., Saíke, Y. e Kodama, T., 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 911 – 915.
- Orlowski, I. M., 1991. *Mucor* Dimorphism. *Microbiol. Rev.*, 55, 234 – 258.
- Osmani, A. E Scrutton, M. C., 1985. The sub-cellular localizations and regulatory properties of pyruvate carboxylases from *Rhizopus arrhizus*. *Eur. J. Biochem.*, 147, 119 – 128.
- Park, J.-C., Matsuoka, H., Takatori, K., Kurata, H., 1996. Adaptation of *Aspergillus niger* to acidic conditions and its relationship to salt stress and miconazole. *Mycol. Res.* 100 (7), 869 - 874.
- Pothuluri, J. V., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Fu, P. P., Cerniglia, C. E., 1998a. Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. *J. Toxic. Environ. Health*, 53, 153 - 174.
- Pothuluri, J.V., Sutherland, J. B., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E., 1998b. Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3106 – 3109.

- Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F. E., Cerniglia, C. E., 1992. - Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3654 – 3659.
- Prince, R. C., 2002. Petroleum and other hydrocarbons, biodegradation of. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (G. Bitton, G., ed.) John Wiley, New York, 2402 - 2416.
- Radwan, S.S., Al-Hasan, R. H., Salamah, S. e Al-Dabbous S., 2002. Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *Inter. Biodet. Biodeg.*, 55 - 59.
- Reddy, C. S., Acosta, D., Davis, P. J., 1991. Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its O-alkyl homologues with *Cunninghamella* species. *Xenobiotica*, 20, 1281 – 1297.
- Roth, J., Zuber, C., Komminoth, P., Sata, T., Li, W. -P. and Heitz, P. U., 1996. Applications of immunogold and lectin-gold labeling in tumor research and diagnosis. *Histochem. Cell Biol.*, 106, 131 - 148.
- Schwartz, H., Liebig Weber, A., Hochstatter, H., Bottcher, H., 1996. Microbial oxidation of ebastine. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, pp. 731 – 735.
- Shipton, W. A. e Lunn, J. A., 1980. Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. *Transactions of British Mycological Society*, 74, 483 – 491.

- Spies, R. B., Andresen, B. D. e Rice, J. R. D. W., 1987. Benzothiazoles in estuarine sediments as indicators of street runoff. *Nature*, 327, 697 - 699.
- 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.
- Song, C. e Ma, X., 2003. New design approaches to ultra-clean diesel fuels by deep desulfurization and deep dearomatization. *Appl. Catal. B: Environ.*, 41, 207 – 238.
- Sutherland, J. B., 1992. Detoxification of polycyclic hydrocarbons by fungi. *Journal of Ind. Microbiol.*, 9, 53 - 62.
- Tham, L., X., Matsushashi, S., Kume, T., 1999. Growth and Fruit Body Formation of *Gracioderma lucidum* on Media Supplemented with Vanadium, Selenium and Germanium. *Mycoscience*, Tóquio. 40, 87 – 92.
- Tombs, M. P. e Blake, G. G., 1982. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. *Bioch. Bioph. Acta*. 700, 81 - 89.
- Trudel, J. e Asselin, A., 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 189, 249 – 253.

- Valle, C. E., 1995. Qualidade Ambiental: como ser competitivo protegendo o meio ambiente (como se preparar para as normas ISO 14000). Pioneira, São Paulo, 137.
- Van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J. E Truper, H G., 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. *Arch. Microbiol.*, 153, 324 – 328.
- Volkering, F.; Breure, A. M.; van Andel, J. G. 1993. Effect of Microorganims on the Bioavailability and Biodegradation of Crystalline Naphtalene. *Appl. Microb. Biotech.*, 40, 535 - 540.
- Volesky, B., Holan, Z. R., 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog. Washington.* 11, 235 – 250.
- Vorisek, J. e Pokorny, V., 1975. Cytochemical detection of polysaccharides on the surface of the cell membrane complex in fungi. *Arch. Microbiol.*,102, 293 - 298.
- Wang, P. e Krawiec, S., 1994. Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hidroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strain. *Arch. Microbiol.*, 161, 266 – 271.
- Weber W.J. Jr. e Corseuil H.X., 1994. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Wat. Res.* 28, 1407 – 1414.

- Weitzman, I., Whittier, S., Mckitrick, J. C., Della-Latta, P., 1995. Zygosporangium: The Last Word in Identification of Rare and Atypical Zygomycetes Isolated from Animal Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 781 – 783.
- Yamada, K., Minoda, Y., Kodama, K., Nakati, e Akasake, T., 1968.- Microbial conversion of petro-sulfur compounds, isolation and identification of dibenzothiophene utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 32, 840 – 845.
- Young, T. W. K., 1969. Electron and Phase-Contrast Microscopy of Spores in Two Species of Genus *Mycotypha* (Mucorales). *J. Gen. Microbiol.*, 55, 243 –249.
- Yu, B., Xu, P., Shi, Q. e Ma, C. Q., 2006. Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 54 – 58.
- Yu, B., Xu, P., Zhu, S. S., Cai, X. F., Wang, Y., Li, L., Li, F. L., Liu, X. Y. and Ma, C. Q. 2006. Selective biodegradation of S and N heterocycles by a recombinant *Rhodococcus erythropolis* strain containing carbazole dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2235 – 2238.
- Xu, P., Yu, B., Li, F. L., Cai, X. F. and Ma, C. Q. 2006. Microbial degradation of sulfur, nitrogen, and oxygen heterocycles. *Trends Microbiol.* 14, 398 – 405.
- Zahra, E., Giti, E., e Sharareh, P., 2006. Removal of dibenzothiophene, biphenyl and phenol from waste by *Trichosporon* sp. *Sci. Res. Essay.* 1(3), 072 - 076.

Zhang, D., Yang, Y., Leakey, J. E., Cerniglia, C. E., 1996. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. FEMS microb. Lett., 138, 221 – 226.

Zhang, D., Freeman, J. P., Sutherland, J. B., Walker, A. E., Yang, Y., Cerniglia, C. E., 1996a. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol., 62, 798 – 803.

Zhang, D., Hansen, E. B. J. R., Deck, J., Heinze, T. M., Sutherland, J. B., Cerniglia, C. E., 1996b. Fungal biotransformation of the antihistamine azatadine by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol., 62, 3477 – 3479.

PRIMEIRO ARTIGO

METABOLISMO DO DIBENZOTIOFENO POR *Cunninghamella*
elegans (UCP 596)

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico
Applied and Environmental Microbiology

Metabolismo do Dibenzotiofeno por *Cunninghamella elegans*

Souza, P. M.^{1,2}, Manfred Schwartz³, Nascimento, A. E.², Campos-Takaki, G. M.^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

³Departamento de Química, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE – Brasil, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE, Brazil

*E-mail: takaki@unicap.br/ tyttams@hotmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica de utilização do dibenzotiofeno, analisando os produtos gerados pelo metabolismo de *Cunninghamella elegans* UCP 596. O fungo foi cultivado em presença do composto organosulfurado dibenzotiofeno, nas concentrações de 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM, incubados à 28°C sob agitação orbital de 150 rpm por 96 horas foram extraídos com o volume igual de acetato de etila (60mL/60mL); os extratos foram rotoevaporados, ressuspensos em 2mL de acetato de etila e analisados por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). O fungo crescido no meio de cultura Sabouraud contendo 0,50 mM de DBT foi capaz de degradar 97% do DBT inicial. No meio de cultura Sabouraud tratado com 1,0 mM de DBT, apresentou uma redução no conteúdo de DBT para 0,019 mM, com 96 horas de crescimento, redução de 98,1% do DBT inicial. No meio de cultura tratado com 2,0 mM de DBT, o fungo metabolizou completamente o DBT, nas primeiras 24 horas de crescimento. *C. elegans* (UCP596) foi capaz de metabolizar o dibenzotiofeno e os metabólitos formados foram 5-óxido dibenzotiofeno, 5,5-dióxido dibenzotiofeno e 2- hidroxibifenil, sugerindo a utilização da via metabólica “4S” pelo fungo. Outro metabólito identificado na degradação do DBT por *C. elegans* foi o ácido benzóico sugerindo a via dioxigenação angular, como uma segunda via metabólica, onde o DBT é consumido como fonte de carbono, o enxofre é removido na forma de íon sulfito, apresentando o ácido benzóico como produto final do catabolismo por *C. elegans*.

Palavras Chaves: *Cunninghamella elegans*, Dibenzotiofeno, Degradação, Enxofre, Metabólitos.

1. Introdução

A poluição ambiental, a chuva ácida e problemas de saúde são causados pela emissão de dióxido de enxofre para a atmosfera com a combustão de frações de petróleo. Para solucionar estes problemas, regulamentações são cada vez mais severas a fim de reduzir ao máximo, os níveis de enxofre emitidos para atmosfera. A hidrodessulfurização (HDS) é uma tecnologia convencional usada para remoção de enxofre de combustíveis fósseis. A remoção é realizada utilizando catalisadores metálicos e gás de hidrogênio, mas apesar das pressões e temperaturas extremamente elevadas, o processo não elimina os compostos organosulfurados heterocíclicos, como principalmente o dibenzotiofeno (DBT). A hidrodessulfurização é uma técnica muito eficaz para remover tióis, sulfetos e dissulfetos, mas não é adequada para a remoção de compostos tiofênicos. As indústrias petroquímicas têm buscado tecnologias que possibilitem a remoção de enxofre destes compostos heterocíclicos. Uma alternativa é a biodessulfurização (BDS), processo mais eficiente e de baixo custo, que utiliza microrganismos para dessulfurizar estes compostos, promovendo metabolização seletiva do enxofre (atacando C-S) sem degradar o esqueleto carbônico (C-C), mantendo a fonte energética da molécula intacta (Nakajima e Sakagushi, 1986, Cotoras, 1992, Izumi et al., 1994, Oliveira, 2001). Dibenzotiofeno é considerado um composto modelo para estudos de dessulfurização biológica de combustíveis fósseis e para estudos de compostos persistentes como S-heterocíclicos no ambiente (Yamada et al., 1968, Spies et al., 1987, Li et al., 2003). Vários microrganismos têm sido estudados, para a remoção bioquímica de enxofre do DBT. Organismos procarióticos que dessulfurizam compostos organosulfurados sem metabolizar o esqueleto de carbono são pouco comuns e geralmente são utilizadas em vias de oxidação seletiva de enxofre (Monticello et al., 1985, Monticello e Finnerty, 1985, Crawford e Gupta, 1990, Van Afferden et al., 1990, Faison et al., 1991, Kildane, 1991, Kildane e Jackowski,

1992, Omori et al., 1992, Lee et al., 1995, Grossman, 1999). Organismos eucarióticos, como *Cunninghamella elegans* crescem em DBT, formando DBT-5-óxido e DBT-5-dióxido, mas não há formação do bifenil (Crawford e Gupta, 1990, Schlenk et al., 1994). O fungo *Paecylomyces* sp. retira especificamente o enxofre através da oxidação do DBT e produz 2,2'-dihidroxi-bifenil (Kildane, 1990, Faison et al., 1991). Oxidação biológica de enxofre é primeiramente catalisada por dois sistemas enzimáticos, P450 monooxigenases e monooxigenases contendo flavina (FMO). Contudo, na maioria dos microrganismos, as enzimas responsáveis pela oxigenação do enxofre (S-oxigenação), não têm sido claramente identificadas. *Cunninghamella elegans* catalisa a S-oxigenação de DBT. Conseqüentemente, foram identificados oxigenases como responsáveis pela S-oxigenação de DBT em *C. elegans* (Crawford e Gupta, 1990, Schlenk et al., 1994).

Considerando a relevância do impacto global da poluição gerado por compostos organosulfurados, este trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica de utilização do dibenzotiofeno, analisando os produtos gerados pelo metabolismo de *C. elegans*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e Condição de Cultivo - *Cunninghamella elegans* (UCP-596) isolado de sedimento do manguezal do rio Formoso, Rio Formoso, Pernambuco, mantido no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco. O fungo foi repicado para meio de cultura batata dextrose e ágar (BDA) para produção de esporos e incubado à 28 °C por 6 dias. Após este período, alíquotas da suspensão de esporos contendo 10^7 esporangiólos/mL correspondentes a 5% de inóculo foram inoculadas em Erlenmeyer, com capacidade para 500mL, contendo 100mL de meio de cultura Sabouraud líquido (cultura controle) e meio Sabouraud líquido tratados com dibenzotiofeno em diferentes concentrações 0,50 mM, 1,0 mM, 2,0 mM. Em

seguida, as amostras foram incubadas, sob agitação orbital de 150rpm, à 28°C e retirados após 24h, 48h, 72h, e 96h de cultivo. A partir do líquido metabólico foi realizada a extração para cromatografia segundo o método utilizado por Labana et al., 2005. A solução estoque de dibenzotiofeno utilizada neste trabalho foi preparada com N,N-dimetilformamida na concentração de 1 M (p/v).

2.2. Degradação de Dibenzotiofeno

Para determinar os compostos intermediários da via metabólica utilizada por *C. elegans* para degradar o DBT, os sobrenadantes citados anteriormente no item (2.1.) foram extraídos com o volume igual de acetato de etila (60mL/60mL). A camada orgânica foi removida e a camada aquosa foi acidificada para pH 2,0, com solução de 5N de HCl, extraído com igual volume de acetato de etila. Os extratos foram rotoevaporados a vácuo e ressuspensos em 2 mL de acetato de etila e analisados em Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (GC-MS).

A cromatografia gasosa foi analisada no Cromatógrafo Gasoso VARIAN STAR 3600 CX, acoplados a um espectrômetro de massa VARIAN SATUR 2000. Com uma coluna CP-WAX 58 FFAP-CB; 50 METROS; 0,32mm ID; DF = 0,2mm. O Gás de arraste utilizado foi o hélio 5,0 WHITE MARTINS, pressão 8 PSI. A temperatura programada foi de 50°C por 5 min, aumentando 10°C min⁻¹, até chegar a 250°C por 5 minutos, com o tempo total de 30 minutos. Injetor e detector de temperatura foi 250°C. Cerca de 3,0mL de cada solução extraída com acetato de etila foram injetados no cromatógrafo. A espectrometria foi realizada a 70 eV. A velocidade da varredura foi 1,5 scans s⁻¹ de m/z 40 a 500. As amostras contendo DBT também foram analisadas através de GC/MS; A identificação foi realizada com a comparação dos

espectros de massa obtidos na biblioteca MAINLIB do sistema de GC/MS e do Spectral Database for Organic Compounds SDBS library.

3. Resultados

A figura 1 demonstra a degradação do DBT nas concentrações de 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM em função do tempo. O isolado de *C. elegans* crescido no meio de cultura Sabouraud adicionado de 0,50mM de DBT foi capaz de degradar cerca de 70% de DBT em 24 horas de crescimento, e ao final do experimento com 96 horas de cultivo reduziu para 0,015mM, cerca de 97% de transformação do DBT. Por outro lado, a amostra de *C. elegans* crescida em meio Sabouraud contendo 1,0mM de DBT, apresentou uma redução de cerca de 44%, nas primeiras 24 horas de crescimento e ao término da fermentação reduziu o conteúdo de DBT para 0,019mM, de cerca de 98,1%. A amostra crescida em 2,0mM de DBT, não apresentou conteúdo de DBT em nenhum dos tempos estudados, comprovam que o DBT foi metabolizado por *C. elegans* antes das primeiras 24 horas de crescimento.

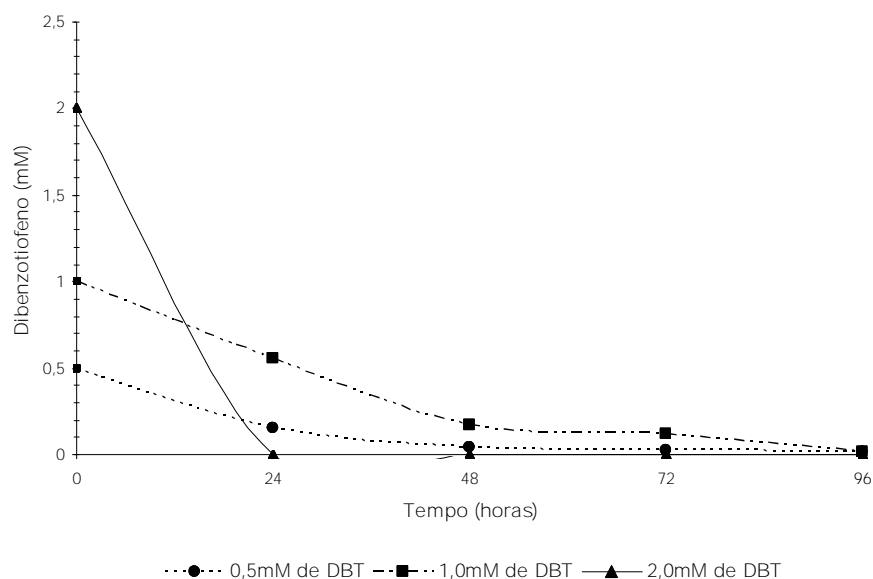


Figura 1. Degradação do dibenzotiofeno por *Cunninghamella elegans* (UCP 596) em função do tempo no meio de cultura Sabouraud líquido, contendo 0,50mM, 1,0mM e 2,0mM de DBT, à 28°C, por 96 horas, 150rpm.

A cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa, identificou os possíveis produtos de metabolização do DBT por *C. elegans*. A via catabólica do DBT foi proposta, baseada nos metabólitos demonstrados na tabela 1 e pelos espectrogramas de massa encontrados nas Figuras 4-7. A análise dos metabólitos sugere que *C. elegans* (UCP 596) pode degradar o DBT utilizando duas vias metabólicas.

Tabela 1. Caracterização do espectro de massa dos produtos da degradação do DBT por *C. elegans* (UCP 596)

Íon Molecular (m/z)	Prováveis Compostos Formados	Fragmentos de Íons - m/z (Relativo a Intensidade %)
184	Dibenzotiofeno	185(13,37), 184(100), 139,3(12,14), 45,1(10,43)
200,2	5- Oxido Dibenzotiofeno	201,2(19,05),200,2(100),172,5(43,06),171,5(73,15), 139,3(12,42), 86,3(5,95), 50,2(14,25)
216,1	5,5- Dióxido Dibenzotiofeno	216,1(100),187,2(21,34),144,3(16,12), 104,3(7,98), 50,2(13,12)
170,2	2- Hidroxibifenil	227,3(5,58),170,2(100),140,2(16,10), 114,2(53,73), 85,2(17,38), 41,2(13,38)
105,1	Ácido Benzóico	118,0(22,67), 105,1(100), 58,2(15,49), 45,1(60,30)

Os metabólitos identificados foram 5-óxido dibenzotiofeno, 5,5-dióxido dibenzotiofeno, nas primeiras 48 horas de crescimento e 2- hidroxibifenil no período de 72 horas de crescimento, estes resultados apontam a utilização da via metabólica “4S” pelo fungo, resultado apresentado na figura 2. Os resultados estão de acordo com o trabalho de Schlenk et al., 1994.

Vários produtos de degradação do DBT foram detectados nestes estudos, porém não foi observada a dessulfurização com a formação de 2-hidroxibifenil; no entanto, existe a formação de 5-5 dióxido dibenzotiofeno, composto encontrado na Via “4S”.

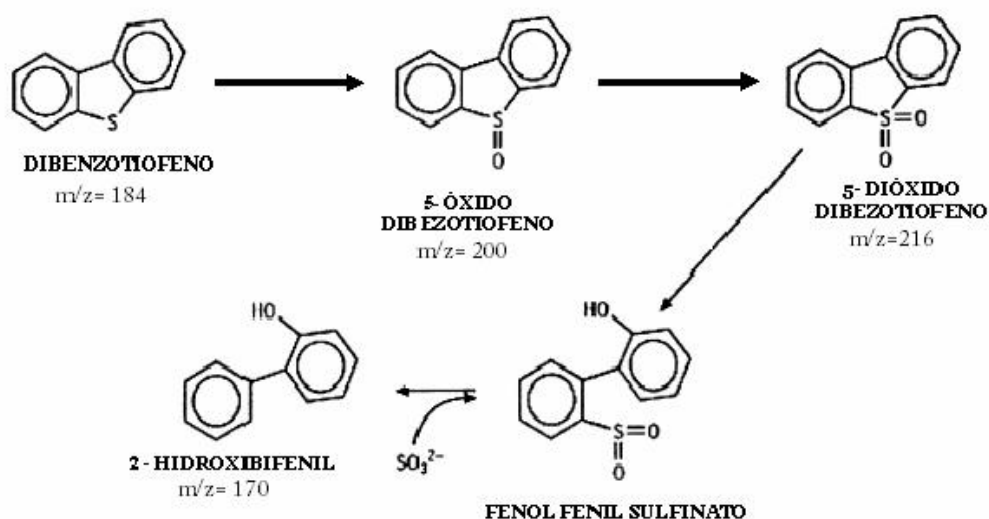


Figura 2. Proposta de via metabólica utilizada por *Cunninghamella elegans* (UCP 596) para remover o enxofre do DBT no meio de cultura Sabouraud líquido à 28°C, sob agitação de 150rpm.

A figura 3 apresenta a via dioxigenação angular, que utiliza o DBT como fonte de carbono, removendo o enxofre, formando sulfito e sulfato, e como produto final o ácido benzóico. Neste trabalho, o DBT foi catabolizado por *C. elegans* para os compostos 5-óxido dibenzotiofeno, 5,5-dióxido dibenzotiofeno, nas primeiras 48 horas de crescimento, culminando na formação do ácido benzóico, no período de 72 horas de crescimento.

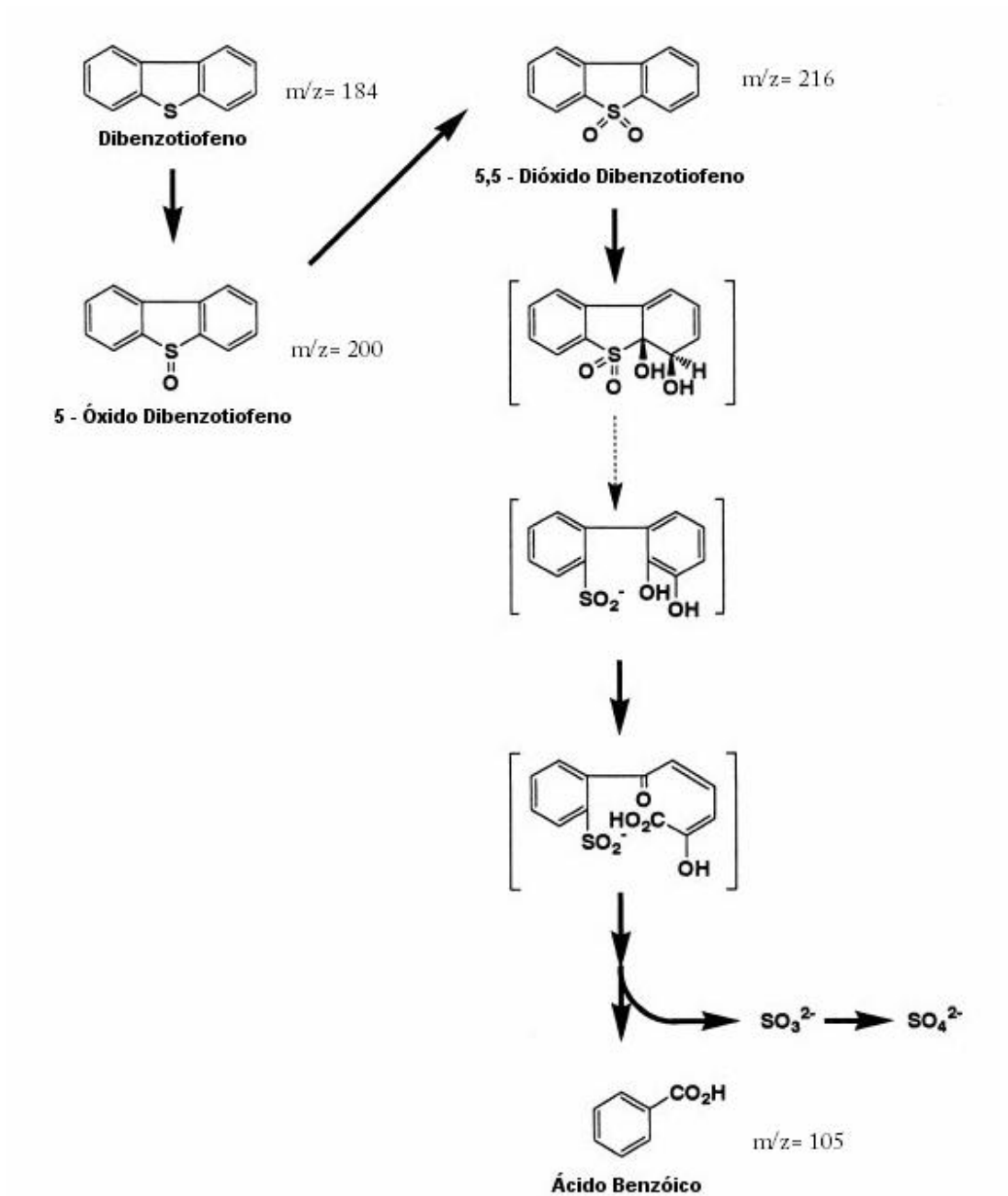


Figura 3. Proposta de via metabólica utilizada por *Cunninghamella elegans* (UCP 596) para remover o enxofre do DBT inserido no meio de cultura Sabouraud líquido, à 28°C, sob agitação de 150rpm.

As figuras 4-7 confirmam os quatro compostos encontrados: 5-óxido dibenzotiofeno (38,7min, $m/z = 200,2$), 5,5-dióxido dibenzotiofeno (29,1min. $m/z = 216,1$), 2-hidroxibifenil (22,4min., $m/z = 170,2$) e ácido benzóico (22,3min., $m/z = 105,1$) que foram detectados com a degradação do DBT (26.7 min, $m/z = 184$), por *C. elegans* (UCP 596).

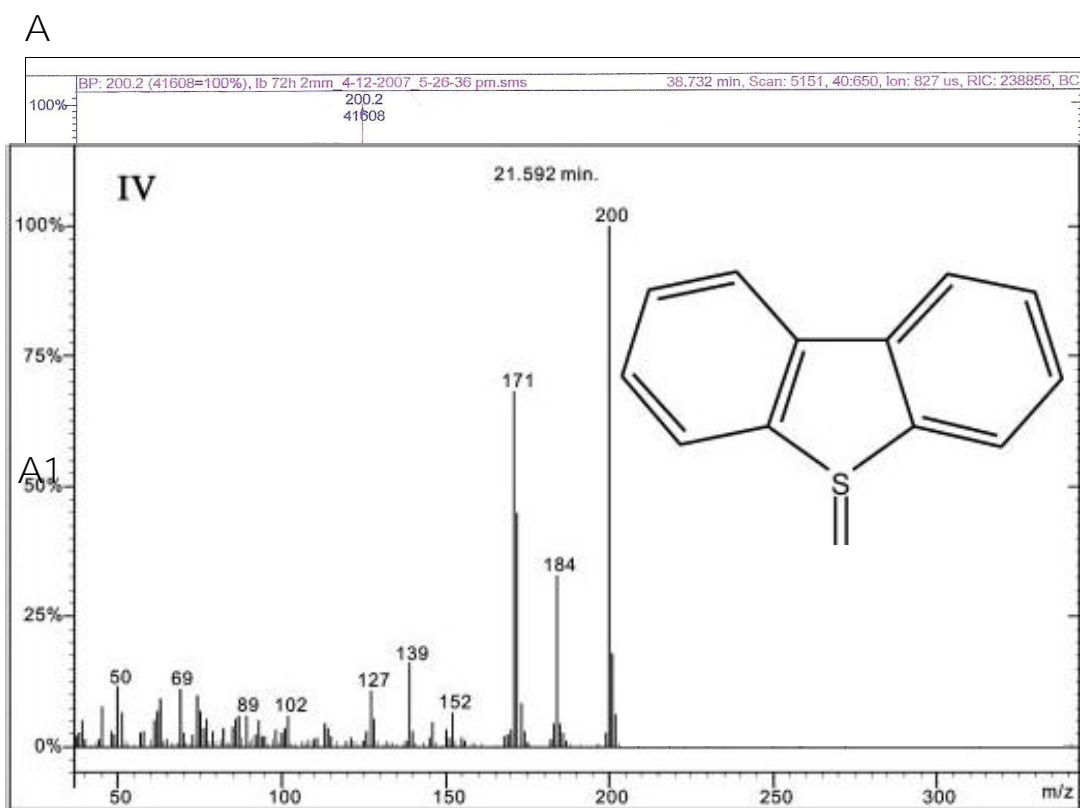


Figura 4. Espectrograma de massa de 5-Óxido Dibenzotiofeno metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por *Cunningamella elegans* após 48 horas de crescimento. A, 5- Óxido Dibenzotiofeno; A1, 5- Óxido Dibenzotiofeno (Gai et al., 2007).

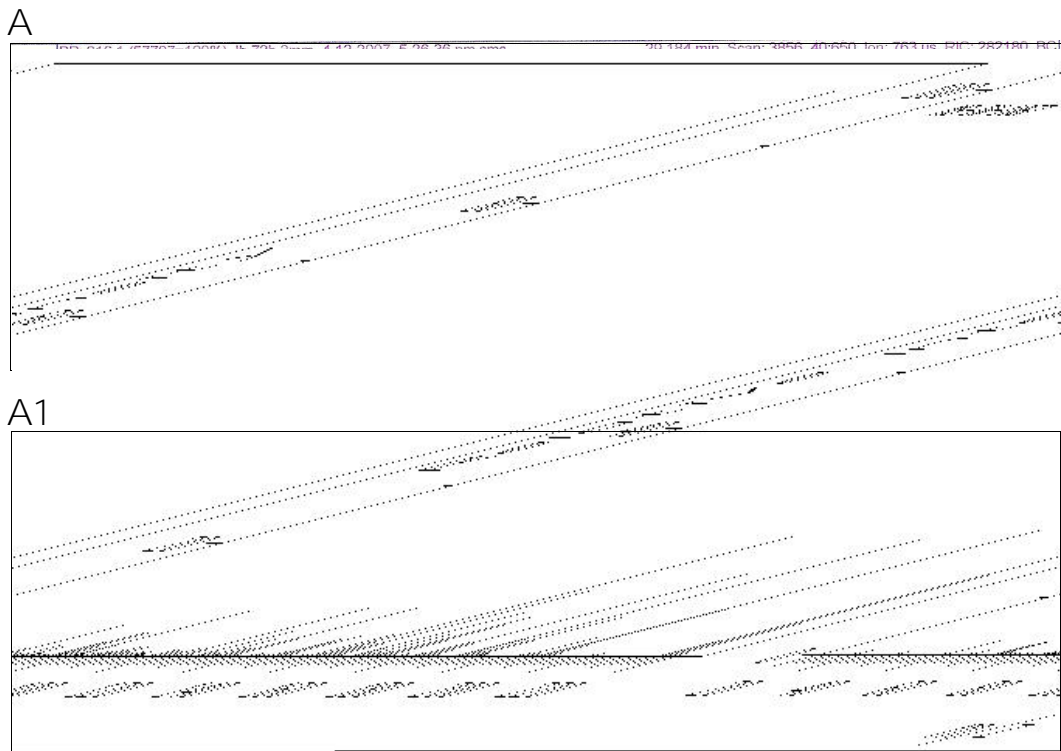


Figura 5. Espectrograma de massa de 5-5 Dióxido Dibenzotiofeno metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por *Cunningamella elegans* após 48 horas de crescimento. A, 5-5 dióxido Dibenzotiofeno; A1, 5-5 dióxido Dibenzotiofeno (Spectral Database for Organic Compounds SDDBS library).

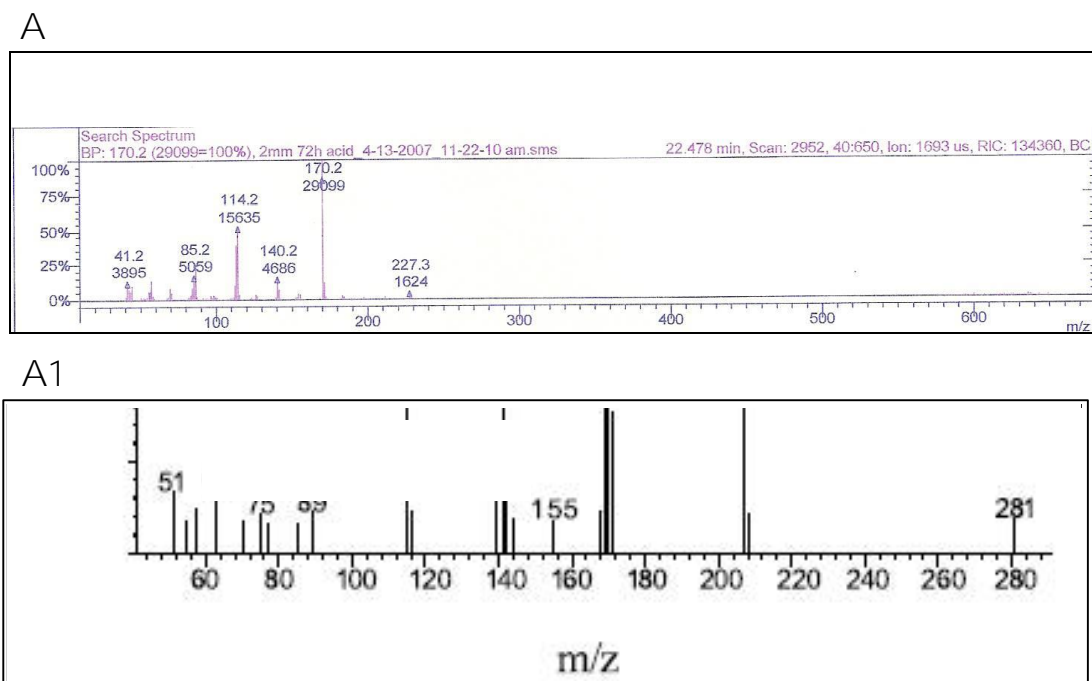


Figura 6. Espectrograma de massa de 2- Hidroxibifenil metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por *Cunningamella elegans* após 72 horas de crescimento. A, 2- Hidroxibifenil; A1, 2- Hidroxibifenil (Castorena, 2002).

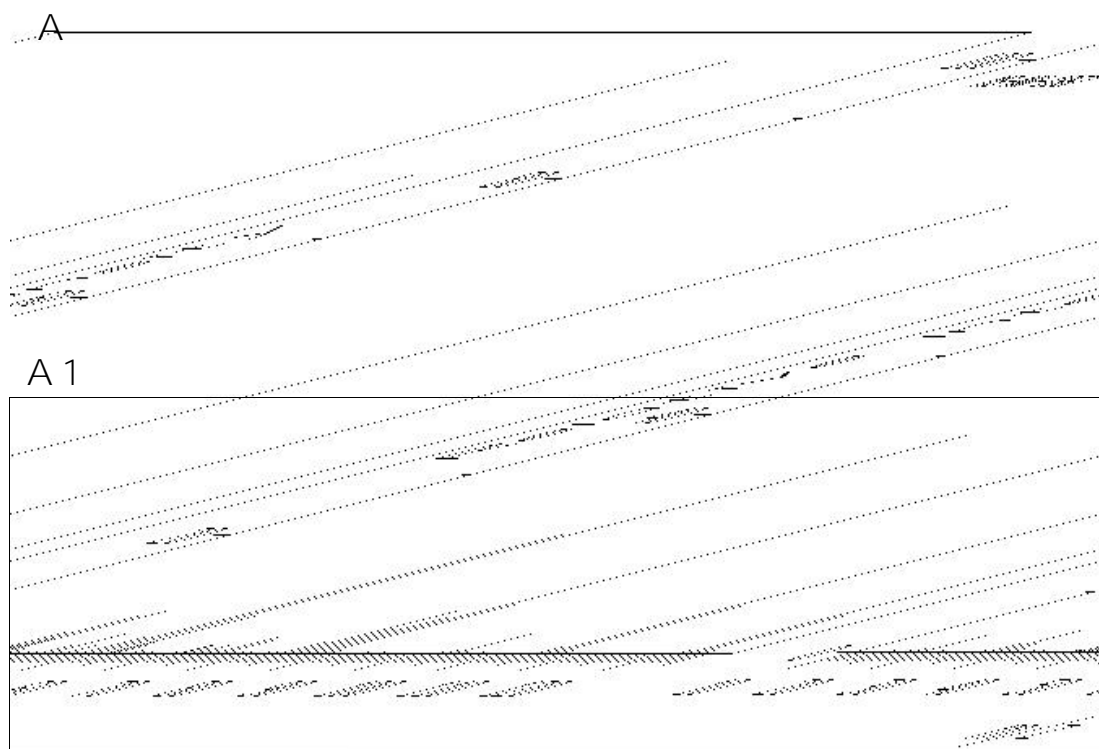


Figura 7. Espectrograma de massa de Ácido Benzoico metabólito formado na degradação do dibenzotiofeno por *Cunningamella elegans* após 72 horas de crescimento. A, Ácido Benzoico; A1, Ácido Benzoico (Spectral Database for Organic Compounds SDBS library).

4. Discussão

A habilidade notável de sobrevivência dos fungos em diferentes nichos é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos, que vêm coexistindo, durante bilhões de anos, com uma enorme variedade de substâncias naturais de diferentes origens. Esta diversidade de substratos, potenciais ao crescimento microbiano, induziu a produção de enzimas aptas a transformarem moléculas orgânicas com estruturas bastante distintas. Os "arsenais" enzimáticos têm sido, inclusive, capazes de atuar sobre substâncias químicas sintéticas, oriundas das atividades humanas. A resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas (Liu e Suflita, 1993, Van Der Meer, 1994, Stenberg, 1999). Entre os fungos, *C. elegans* tem sido reportado por apresentar a habilidade de oxidar e degradar vários

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), tais como antraceno, acenafteno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, fenantreno, fluoranteno e naftaleno, bem como hidrocarbonetos nitrados, que são considerados agentes mutagênicos e carcinogênicos (Griffin, 1994, Pothuluri et al., 1996, Mendonça, 2002).

Durante os últimos anos, os problemas ambientais tem recebido muita atenção de pesquisadores do mundo inteiro. Os compostos orgânicos contendo enxofre constituem uma pequena, mas importante fração de alguns combustíveis e devido a sua difícil biodegradabilidade são considerados compostos recalcitrantes. A presença do enxofre é indesejável por contribuir para a corrosão do equipamento da refinaria, como também pela emissão de óxidos de enxofre (SO_x) para a atmosfera, através da combustão de petróleo, causando problemas ambientais: como poluição do ar e como potencial causador de chuvas ácidas (Kropp et al., 1997). Uma das estratégias para diminuir estas emissões, consiste na remoção do enxofre do carvão mineral, do petróleo e de seus derivados antes da sua combustão. Atualmente, tem sido, utilizado nas refinarias processos físicos e químicos, denominado hidrodessulfurização (HDS), para a remoção de enxofre inorgânico. Esses tratamentos têm custos muito elevados, envolvendo catalisadores químicos sob condições extremas (200 a 425°C) e altas pressões 150 a 205psi (Izumi et al., 1994). O enxofre inorgânico e o enxofre orgânico simples podem ser removidos por HDS, mas este processo é inadequado para produção de combustíveis com baixo teor de enxofre. Visto que, este processo é incapaz de remover o enxofre de compostos complexos policíclicos, contendo enxofre, presente no petróleo e no carvão. Assim, compostos tiofênicos representam grande quantidade de enxofre após o tratamento de HDS em combustíveis. Outra estratégia para reduzir o conteúdo de enxofre é expor estes substratos a microrganismos que podem quebrar especificamente a cadeia carbono-enxofre, liberando o enxofre para porção solúvel-água, em forma inorgânica. Este processo de dessulfurização microbiana ou biodessulfurização (BDS) é

uma técnica eficaz e de baixo custo (Monticello, 2000). Existem três vias bastante conhecidas no processo de degradação de DBT por microrganismos: via de Kodama, via de dioxigenação angular e via sulfóxido, sulfona, sulfonato, sulfato denominada de via “4S” (Van Afferden, 1990, Kilbane e Jackowsky, 1992, Denome et al., 1993, Gallagher et al., 1993, Wang e Krawiec, 1994). A Figura 8 demonstra propostas de vias de degradação microbianas.

Seo et al, (2006) relatou que 5,5-dióxido DBT está envolvido no processo de biodessulfurização pela via 4S (Oldfield et al, 1997). Vias de degradação do DBT por bactérias, tem sido, bastante estudadas, como para: *Arthrobacter* (Lee et al., 1995), *Brevibacterium* (Van Afferden et al., 1993), *Mycobacterium* (Okada et al., 2002, Li et al., 2005, 2007). *Brevibacterium sp.* mineralizou completamente o DBT, utilizando-o como fonte de carbono, enxofre e energia, formando como compostos finais: ácido benzóico, sulfito e água, via conhecida como dióxigenação angular (Van Afferden et al., 1990). Sob condições aeróbicas, 3-hidroxi-2-formil benzotiofeno foi formado pela degradação do DBT pela bactéria *Pseudomonas sp.* (Monticello et al., 1985), 1,2-dihidroxi-1,2-dihidrodibenzotiofeno e 5-óxido dibenzotiofeno foram gerados pela *Beijeninckia sp.* (Laborde e Gibson, 1977). Sob condições anaeróbicas, o composto bifenil foi formado por *Desulfovibrio desulfuricans M6* (Yeong et al., 1990). *Corynebacterium sp. SY1* e *Rhodococcus rhodochrous IGTS8* foram capazes de remover somente o enxofre do DBT, convertendo o DBT no composto 2-hidroxi-bifenil (2-HBP). Estas amostras apresentam habilidade de remover seletivamente o enxofre orgânico sem degradar os átomos de carbono (Omori et al., 1992, Gallagher et al., 1993).

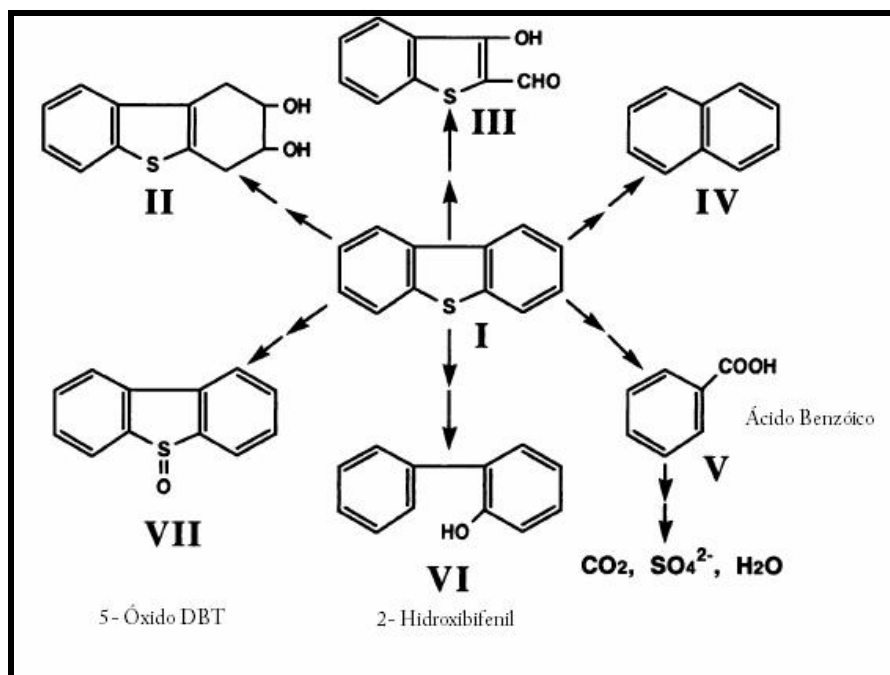


Figura 8. Propostas de vias de degradação do dibenzotiofeno. (I) Dibenzotiofeno, (II) 1,2 -Dihidroxi-1,2-dihidrodibenzotiofeno, (III) 3-hidroxi-2-formil benzotiofeno, (IV) Bifenil, (V) Ácido Benzóico, (VI) 2-Hidroxibifenil e (VII) 5-Óxido dibenzotiofeno.

A oxidação biológica de enxofre é primeiramente catalisada por dois sistemas enzimáticos, P450 monooxigenases e monooxigenases contendo flavina (FMO). Contudo, na maioria dos microrganismos, as enzimas responsáveis pela oxigenação do enxofre (S-oxigenação), não têm sido claramente identificada (Crawford and Gupta, 1990).

O fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 596) foi capaz de degradar o DBT nas três concentrações estudadas (0,50mM, 1,0mM e 2,0mM) após 24 e 48 horas de crescimento, apresentaram os metabólitos 5-óxido dibenzotiofeno, 5,5-dióxido dibenzotiofeno e ao final do período experimental com 96 horas de crescimento foi detectado o composto 2- hidroxibifenil, estes resultados sugerem a utilização da via metabólica sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato “4S” pelo fungo. Via específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT, através de um ataque oxidativo progressivo no grupo tiofênico, esta via envolve um sistema multienzimático com três atividades diferentes A primeira enzima é uma monooxigenase do DBT, que oxida o

DBT para 5,5'-dióxido de DBT, a segunda enzima é igualmente uma monooxigenase que converte 5,5'-dióxido de DBT para 2'-hidroxibifenil-2-sulfinato, finalmente uma liase que catalisa a quebra da ligação C-S transformando o 2'-hidroxibifenil-2-sulfinato em dois produtos finais, 2'-hidroxibifenil (HBP) e sulfato. Os microrganismos que utilizam esta via para metabolizar o DBT conseguem retirar o átomo potencialmente tóxico do composto tiofênico, sob a forma de um composto sulfato, apenas ocorrendo uma ligeira perda do seu valor energético (Wang e Krawiec, 1994, Gray et al.,1996). Deste modo, as estirpes utilizadoras da via “4S” poderão constituir uma ferramenta biológica fundamental, no tratamento em larga escala, dos combustíveis fósseis, caso se consigam obter biocatalisadores em ambiente industrial (Wang e Krawiec, 1994).

Adicionalmente, o ácido benzóico foi detectado após 48 horas de crescimento celular, composto presente na via Van Afferden ou via dioxigenação angular, via que utiliza o DBT como fonte de carbono e remove o enxofre, na forma íon sulfito, tendo como produto final o ácido benzóico. A via metabólica conhecida com via de Van Afferden não tem grande interesse em termos de processos de biodessulfurização de combustíveis fósseis, já que ocorre a mineralização completa da estrutura carbonada, que implicará necessariamente na diminuição da energia química potencial dos combustíveis. Porém, microrganismos utilizadores desta via metabólica são potencialmente úteis na formulação de inóculos microbianos mistos para processos de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos contendo enxofre, liberados no ambiente (Van Afferden, 1990).

Os resultados demonstram que o isolado de *C. elegans* UCP 596 foi capaz de degradar cerca de 70% de DBT em 24 horas de crescimento no meio de cultura Sabouraud tratado com 0,50 mM de DBT, após 96 horas de cultivo com redução de 97% de DBT do conteúdo inicial. Por outro lado, a amostra de *C. elegans* crescida em meio Sabouraud tratada com 1,0 mM de DBT,

apresentou redução de 98,1%, com 96 horas de crescimento, reduzindo a concentração inicial para 0,019 mM de DBT. A amostra tratada com 2,0 mM de DBT, não apresentou conteúdo de DBT em nenhum dos tempos estudados. Os resultados comprovam que o DBT foi metabolizado por *C. elegans* antes das primeiras 24 horas de crescimento.

Segundo Schlenk, (1994) o fungo filamentosso *Cunninghamella elegans* ATCC-36112, metabolizou aproximadamente 98% do dibenzotiofeno, na concentração de 1,8mg/mL, para 5-óxido dibenzotiofeno (86% do total de metabolitos) e 5-dióxido dibenzotiofeno (14% do total de metabolitos), após incubação de 24 horas. O fungo *Pleurotus ostreatus* crescido em meio de cultura contendo DBT foi metabolizado cerca de 84% do organosulfurado em 21 dias de crescimento, os resultados foram analisados por HPLC e os principais compostos formados foram, 5-óxido dibenzotiofeno e 5,5-dióxido dibenzotiofeno. O mecanismo lignolítico do fungo *P. ostreatus* pode estar envolvido na metabolização do DBT (Bezalel et al., 1996).

Arthrobacter sp. utilizou a via dioxigenação angular para metabolização de 5,5-dióxido DBT, composto utilizado como fonte de carbono (Dahlberg et al. 1993).

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Graças a essa habilidade têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais destaca-se a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados: solo, águas superficiais e subterrâneas (Juhász e Naidu, 2000). Tais microrganismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes. Em um ambiente contaminado, os hidrocarbonetos são, geralmente, degradados por bactérias, havendo também a possibilidade de atuação de fungos neste processo. Porém, a contribuição de cada um varia com

os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo (da Cunha, 1996). Desta forma, os fungos consideram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade.

Os fungos são organismos muito versáteis no que diz respeito às condições ambientais. Podem alterar suas atividades metabólicas em resposta a variações das condições físicas e químicas de um ambiente. O padrão de atividade de diferentes biomoléculas informa sobre as suas características celulares, as quais, sem dúvida, expressam as habilidades potenciais de um organismo, em um dado momento metabólico, e sob determinadas pressões ambientais (Fu e Viraraghavan, 2002, Lloyd, 2002). Os fungos têm sido utilizados para o tratamento de resíduos e rejeitos industriais e urbanos. O potencial de uso reside em seu arsenal enzimático, produzido em resposta ao ambiente e secretado como metabólito secundário (Kapoor e Viraraghavan, 1995).

5. Conclusões

O isolado de *C. elegans* UCP-596 crescido no meio Sabouraud metaboliza completamente o DBT na concentração de 2,0 mM, no período de 24 horas de crescimento.

C. elegans UCP-596 apresenta habilidade de metabolizar o dibenzotiofeno, nas concentrações de 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM, com formação dos metabólitos 5-óxido dibenzotiofeno, 5,5-dióxido dibenzotiofeno e 2- hidroxibifenil, sugerindo a utilização da via metabólica “4S” pelo fungo.

Na degradação do DBT por *C. elegans* UCP-596 há a formação do ácido benzóico como produto final do catabolismo celular, resultado que sugere a via dioxigenação angular, como uma segunda via metabólica utilizada pelo fungo.

Agradecimentos

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

Referências

- Bezalel, L., Y. Hadar, P. P. Fu, J. P. Freeman, C. E. Cerniglia. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2554–2559
- Castorena, G., 2002. Sulfur Selective Desulfurization of Dibenzothiophene and Diesel oil by newly Isolated Rhodococcus sp. Strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 215:1, 157–161.
- Crawford, D. e R. K. Gupta. 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr. Microbiol.* 21:229-231.
- Cotoras, D. 1992. Sorption of metal ions by whole cells of *Bacillus* and *Micrococcus*. *Environ. Technology.* 13:551-559.
- Da Cunha, C. D., 1996. “Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, p. 97.
- Dahlberg, M. D., R. L. Rohrer, D. J. Fauth, R. Sprecher e G. J. Olson. 1993. Biodesulfurization of dibenzothiophene sulfone by *Arthrobacter* sp. and studies with oxidized Illinois No. 6 coal. *Fuel*, 72, 1645–1649.

- Denome, S. A., E. S. Olson, K. D. Young. 1993. Identification and Cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. Appl. Environ. Microbiol. 59:2837-2843.
- Faison, B. D., T. M. Clark, S. N. Lewis, C. Y. Ma, D. M. Sharkey e C. A. Woodwrd. 1991. Degradation of Organic sulfur compounds by a coal-solubilizing fungus. App. Bioch. Biotechn. 28:29, 237 – 250.
- Gallagher, J. R., E. S. Olson, D. C. Stanley. 1993. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 107:31-36
- Gray, K. A., O. Pogrebinsky; G. T. Mrachko, C. H. Squires. 1996. Biochemical characterization of the biodesulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 - potencial role in fossil fuel desulfurization (conference abstract). Abstr. Pap. Am. Chem. Soc., 212 Meet., Pt.1, p. BIOL 054.
- Grossman, M. J., M. K. Lee, R. C. Prince, K. K. Garrett, G. N. George, I. J. Pickering. 1999. Microbial Desulfurization of a Crude Oil Middle-Distillate fraction: Analysis of the Extent of Sulfur Removal and the Effect of Removal on Remaining Sulfur. App. Environ. Microbiol. 65:181- 188.
- Juhasz, A. L. e Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration e Biodegradation. 45:57-88.

Kilbane, I., J. J., 1990. Sulfur specific microbial metabolism of organic compounds. Res. Conserv. Recycl. 3:69 – 79.

Kilbane, I., J. J. 1991. Microbiol removal of organic sulfur from coal: current status and research needs. In. Bioprocessing and Biotreatment of coal, edited by D.L., Wise (New York: Marcel Decker), 487 - 505.

Kilbane, I., J. J. e Jackowski, K., 1992. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Biotechn. Bioengin. 40:1107 – 1114.

Labana, S., G. Pandey e R. K. Jain. 2005. Desulphurization of dibenzothiophene and diesel oils by bacteria. Letters in Applied Microbiology. 40:3, 159-163(5).

Laborde, A. L. e D. T. Gibson. 1977. Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species. Appl. Environ. Microbiol. 34:783-790.

Lee, M. K., J. D. Senius e M. J. Grossman. 1995. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. Appl. Environ. Microbiol. 61:4362-4366.

Li, F., P. Xu, C. Ma, Y. Zheng, Y. Qu. 2003. Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. J. Chem. Enginee. Japan 36: 1174–1177.

- Li, W., Y. Zhang, M. D. Wang, Y. Shi. 2005. Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated Microbacterium strain ZD-M2. *FEMS Microbiol Lett.* 247:45 – 50.
- Li, F., Z. Zhang, J. Feng, X. Cai, P. Xu. 2007. Biodesulfurization of DBT in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. *J. Biotechnol.* 127: 222-228.
- Lloyd, J. R., D. R. Lovley. 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotech.* 12:248-253.
- Monticello, D. J. e W. R. Finnerty. 1985. Microbial desulfurization of fossils fuel. *Annual Rev. Microbiol.* 39:371-389.
- Monticello, D. J., D. Bakker, W. R. Finnerty, 1985. Plasmid-Mediated degradation of dibenzothiophene by a *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:756 - 760.
- Nakajima, A., T. Sakagushi. 1986. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.* 24:59-64.
- Okada, H., N. Nomura, T. Nakahara, K. Maruhashi. 2002. Analysis of dibenzothiophene metabolic pathway in *Mycobacterium* strain G3. *J. Biosc. Bioeng.* 93: 491–497.

- Oldfield, C., O. Pogrebinsky, J. Simmonds, E. Olson, C. F. Kulpa. 1997. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiol.* 143:2961–2973.
- Oliveira, F. J. S., 2001. “Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, p. 110.
- Omori, T., L. Monna, Y. Saiki, T. Kodama. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:11–5.
- Seo, J. S., Y. S. Keum, I. Cho, Q. X. Li. 2006. Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P1-1 *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58:36-43.
- Schlenk, D., R. J. Bevers, A. M. Vertino, C. E. Cerniglia. 1994. P450 catalysed S-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans* *Xenobiotica.* 24:11, 1077 - 1083.
- Spies, R. B., B. D. Andresen e Rice, J. R. D. W. 1987. Benzothiazoles in estuarine sediments as indicators of street runoff. *Nature.* 327:697-699.
- Yamada, K., Y. Minoda, Kodama, K. Nakati e T. Akasake. 1968. Microbial conversion of petro-sulfur compounds, isolation and identification of dibenzothiophene utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 32:840 – 845.

Yeong, K. H., T. S. Kim e B. H. Kim. 1990. Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide. *Biotechnol. Lett.* 12:761-764.

Van, A. M., S. Schacht, J. Klein, e H. G. Truper. 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. *Archives Microbiol.* 153:324-328.

Van, A. M., D. Tappe, M. Beyer, H. G. Trüper, J. Klein. 1993. Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds. *Fuel.* 72: 1635-1643.

Wang, P., e S. Krawiec. 1994. Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 161:266-271.

SEGUNDO ARTIGO

Efeito do Dibenzotiofeno no Crescimento, na Morfologia e na
Ultraestrutura de *Cunninghamella elegans*

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico

Bioresource Technology

Efeito do Dibenzotiofeno no Crescimento, na Morfologia e na Ultraestrutura de *Cunninghamella elegans*

Souza, P. M.^{1,2}; Marinho, P. H.²; Lima, M. A. B.²; Moura, G. F.²; Nascimento, A. E.^{2,3}; Campos-Takaki, G. M.^{2,4}

¹Pós-Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

³Departamento de Biologia - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

⁴Departamento de Química - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil.

tyttams@hotmail.com

Resumo

Este trabalho teve como finalidade estabelecer os aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos do isolado de *Cunninghamella elegans* UCP-596 cultivado em meio contendo diferentes concentrações do dibenzotiofeno. Os resultados obtidos indicaram que as amostras crescidas em presença de dibenzotiofeno apresentaram maior crescimento em relação ao controle e são capazes de consumir toda a fonte de carbono, em 24 horas de cultivo. Ocorreu redução no pH da amostra controle nas primeiras 24 horas de cultivo, o que não ocorreu nas amostras tratadas com DBT. Variação no perfil de proteínas totais foi detectada. O dibenzotiofeno induziu variações na morfologia celular do isolado de *C. elegans* UCP-596, analisadas por microscopia óptica. Além disso, o DBT na concentração de 2mM induziu alterações no padrão de ramificação das hifas, como: bifurcações bilaterais ou unilaterais; aumento na quantidade de ramificações; surgimento de protuberância na base da ramificação primária; e hifas mais delgadas. A intensidade de marcação de actina é influenciada pela presença do dibenzotiofeno na distribuição no citoplasma e parede celular, na forma de filamentos e/ou de grumos, dados observados por meio de microscopia de fluorescência. O dibenzotiofeno induziu o surgimento de inúmeros corpos globosos e densos, distribuídos por toda a hifa, variações associadas à textura e eletrondensidade das hifas, aumento da quantidade de ramificações e presença de clamidósporos em *C. elegans* (UCP – 596), dados analisados por microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-Chave: *Cunninghamella elegans*; Dibenzotiofeno; Biodegradação; Morfologia; Ultraestrutura.

1. Introdução

O petróleo e o carvão são importantes combustíveis fósseis que apresentam composição complexa, como: hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos, moléculas contendo nitrogênio, enxofre ou oxigênio na sua estrutura. A biorremediação de petróleo caracteriza-se como uma tecnologia limpa e de baixo custo, que permite a recuperação de locais contaminados através da utilização de microrganismos, que possuem capacidade de degradar o petróleo, convertendo substâncias complexas em moléculas mais simples e/ou voláteis. Dessa forma, os investimentos nesta área estão consolidados em todas as grandes companhias de petróleo do mundo (Van Afferden et al., 1990; Bezalel et al., 1996; Oliveira, 2001; Li et al., 2003; Jong-Su et al., 2006).

Todos os combustíveis fósseis apresentam em sua composição compostos orgânicos sulfurados. Dentre os compostos organosulfurados, o dibenzotiofeno (DBT) e seus derivados são considerados como mais representativos, para processos de biodessulfurização. A remoção seletiva do enxofre é desejável sob o ponto de vista prático, considerando que significativas quantidades de compostos contendo enxofre estão presentes nos combustíveis fósseis, e sua combustão conduz a liberação de óxidos sulfurados que contribuem para a chuva ácida e a poluição do ar. Contudo, compostos tiofênicos, como o DBT, são refratários a dessulfurização química, sendo, portanto um composto modelo para a biodessulfurização (Abbad-Andaloussi et al., 2003; Li et al., 2003, Gunam et al., 2006).

Os fungos demonstram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade. Dentre os fungos, os Zygomycetes, devido ao seu potencial nos processos de biodeterioração, biodegradação; bem como seu papel na indústria, na produção de enzimas, ácidos graxos, antibióticos, conservantes e

ácidos lácticos, apresenta grande importância econômica (Dube, 1978; Tombs e Blake, 1982; Endo et al., 1985; Kapoor e Viraraghavan, 1995; Volesky e Holan, 1995; Alexopoulos, 1996; Carlile e Watkinson, 1996; Da Cunha, 1996; Herrera e Ulloa, 1998; Baik et al., 2002; Mahony et al., 2002, Romero et al., 2005).

A literatura revela um crescente aumento dos estudos com espécies do gênero *Cunninghamella* devido sua habilidade de metabolizar compostos xenobióticos através da excreção de hidrolases. Dessa forma, esses organismos são estudados em função de sua potencialidade nos processos de biodegradação e biotransformação (Baijal e Mehrotra, 1980; Foster et al., 1991; Reddy et al., 1991; Pothuluri et al., 1992; Cervantes et al., 1994; Schwartz et al., 1996; Zhang et al., 1996a; Pothuluri et al., 1998a, 1998b; Ambrósio e Campos–Takaki, 2004; Eibes et al., 2006).

A identificação das variáveis associadas ao metabolismo de *C. elegans* frente à presença de agentes recalcitrantes, especificamente o dibenzotiofeno, representa a superação de mais uma etapa na otimização de processos de biorremediação, que culminam com o desenvolvimento de tecnologias alternativas para a minimização e/ou remoção completa dos poluentes derivados de petróleo. Considerando a relevância do impacto global da poluição gerado pelo petróleo e/ou seus derivados, este trabalho teve como objetivo investigar a fisiologia, morfologia e ultraestrutura de *Cunninghamella elegans* (UCP – 596) na ausência e presença de dibenzotiofeno.

2. Métodos

2.1. Microrganismo e Condição de Cultivo

Cunninghamella elegans (UCP-596) isolado de sedimento do manguezal do rio Formoso, Rio Formoso, Pernambuco, mantidos no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais –

Universidade Católica de Pernambuco foi utilizado neste estudo. O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio de cultura batata dextrose e agar (BDA) à temperatura de 28°C até a esporulação. Após esse período, os esporos foram coletados com o uso de cotonetes, previamente esterilizados e umedecidos em água destilada estéril, sendo determinado o número de esporos em câmara de Neubauer. Alíquotas da suspensão de esporos contendo 10^7 esporos/mL correspondentes a 5% de inóculo foram inoculadas em Erlenmeyer com capacidade para 500 mL contendo 100mL do meio Sabouraud líquido (cultura controle) e meio Sabouraud líquido tratados com dibenzotiofeno em diferentes concentrações 0,50 mM, 1,0 mM, 2,0 mM. Em seguida, as amostras foram incubadas, sob agitação orbital de 150rpm, à 28°C.

A solução estoque de dibenzotiofeno utilizada neste trabalho foi preparada com N-N-dimetilformamida na concentração de 1 M (p/v).

2.2. Perfil de Crescimento de C. elegans

2.2.1. Determinação da Curva de Crescimento

O micélio coletado, nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96 horas de cultivo, segundo as condições de cultivo descritas no item 2.1, foram lavados, congelados, liofilizados, e mantidos em dessecador a vácuo até peso constante. A curva de crescimento foi determinada a partir da média de triplicatas.

2.2.2. Determinação do pH

As variações de pH dos meios de cultura foram acompanhadas ao longo do crescimento nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96 horas de cultivo. O resultado do pH em cada ponto do intervalo foi referente à média de três aferições. Posteriormente, uma curva de pH foi estabelecida com esses valores.

2.2.3. Determinação do Teor de Glicose

Para determinar o consumo de glicose remanescente do meio de cultura, alíquotas de 5 mL do cultivo do fungo em Sabouraud líquido foram coletadas nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96 horas e dosadas, por meio do método enzimático-colorimétrico usando o (“Kit” Biosystems), para glicose oxidase, padrão da glicose 100mg/dL, com o máximo de absorção em 500nm. Dosagens realizadas em triplicatas.

2.2.4. Determinação das Proteínas Totais

Para determinar o teor de proteínas totais remanescente do meio de cultura, alíquotas de 5 mL do cultivo do fungo no meio Sabouraud líquido foram coletadas nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96 horas e dosadas por meio do “Kit” Labtest, onde os íons cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino (Regente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, tendo como padrão 4,0g/dL e absorbância máxima em 545nm. Dosagens realizadas em triplicatas.

2.3. Estudos Morfológicos

2.3.1. Microscopia Óptica

A morfologia de *C. elegans* foi analisada a partir da técnica de microcultivo (Mendes-Giannini e Melhem, 2001). O meio de cultura utilizado foi Sabouraud Dextrose Ágar sem DBT e nas diferentes concentrações 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de dibenzotiofeno. As placas foram incubadas à 28°C, após 24 e 48 horas de crescimento, as lamínulas foram retiradas com auxílio de uma pinça, coradas com azul de Amann, para observação das alterações nos padrão de ramificação das hifas. As amostras foram observadas através de microscopia óptica nos aumentos de 400X e 1000X.

2.3.2. Microscopia de Fluorescência - Filamentos de Actina (Shari'a et al., 1999)

As amostras de biomassa coletadas, na curva de crescimento, foram lavadas em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2, aderidas a lâminas de vidro cobertas com poli-L-lisina, durante 1 hora à 3°C, fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS por 1 hora, a temperatura ambiente, lavadas em tampão PBS, duas vezes e submetidas a permeabilização com uma solução contendo triton X 100, (0,01%) em tampão PBS, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Foram feitas lavagens sucessivas em tampão PBS e incubação em Faloidina marcada com Isotiocianato de fluoresceína, overnight a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS, duas vezes, cobertas com albumina 0,1% em PBS e as lâminas montadas com glicerina tamponada pH 9,2. As lâminas foram observadas no Microscópio Axiostar Plus de Fluorescência ZEISS, HBO50/AC e fotografadas. Os aumentos utilizados foram de 400x e 1000x.

2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (De Souza, 2000)

As amostras coletadas foram lavadas em PBS, pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, em temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora, em temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M, sendo posteriormente submetidas ao processo de desidratação utilizando álcool etílico, em proporções de 50%, 70%, 90% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico para eliminação total da fase líquida, seguindo-se a montagem em suportes de alumínio, metalização, análises e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo 5.600LV, operando a 20 Kv. Aumento de 1000x.

3. Resultados

3.1. Perfil de Crescimento de *C. elegans*

Os resultados apresentados na figura 1, demonstram o crescimento logarítmico de *C. elegans*, durante todo o período experimental, no meio de cultura Sabouraud sem DBT, apresentando produção máxima de 0,750g/L de biomassa, com 96 horas de cultivo. A amostra tratada com 0,50 mM de DBT, apresentou o maior rendimento de biomassa correspondendo a 1,003g/L, cerca de 33,8% maior que a amostra controle. As amostras tratadas com 1,0 mM e 2,0 mM apresentaram respectivamente, aumento de biomassa de 24,0% e 19,4% em relação ao controle. Não foi observada a fase estacionária nas condições estudada. Em relação ao consumo da fonte de carbono, glicose, as amostras controle e tratadas com DBT, apresentaram comportamentos semelhantes, onde se verificou o consumo de glicose de 99,93% nas primeiras 24 horas de cultivo. O fungo *C. elegans* foi capaz de crescer em presença de dibenzotiofeno, nas condições estudadas, superando o crescimento da amostra controle. A concentração 0,50mM de DBT por apresentar menos toxicidade a célula proporciona mais facilidade de crescimento e garantindo uma maior produção de biomassa. O microrganismo estudado consumiu toda a glicose nas primeiras 24 horas de crescimento e posteriormente utilizou o composto DBT como fonte de carbono para garantir seu crescimento (dados não demonstrados). *Cunninghamella elegans* (ATCC36112) tem sido relatada na literatura, com habilidade para oxidar dibenzotiofeno no período de 48 horas de crescimento em meio Sabouraud (Crawford, 1990; Donald et al., 1990).

Com relação à curva de pH observou-se que a partir da inoculação dos esporos no meio de cultura Sabouraud líquido e tratados com 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de DBT, com pH inicial de 6,0. O controle apresentou redução de pH para 5,14 nas primeiras 24 horas de cultivo, seguindo de um aumento progressivo para pH 6,6 ao término do cultivo. Esta redução do pH nas

primeiras 24h, e o consumo total da glicose evidencia a produção de metabólitos ácidos que proporcionam o crescimento celular. A amostra crescida em 0,50 mM apresentou maior pH no período de 24h, atingindo pH 6,62 chegando ao término do experimento com pH 6,9. As amostras tratadas com 1,0 mM e 2,0 mM de DBT, o pH foi bastante semelhante, pH 7,0 nas 72 horas e 6,7 e 6,8 respectivamente, no período de 96 horas de cultivo (dados apresentados na Figura 1).

Os resultados referentes ao conteúdo de proteínas extracelulares demonstram que, o controle apresentou 695mg/dL de proteínas extracelulares no período de 24 horas de cultivo. A amostra tratada com 0,50 mM de DBT exibiu o maior conteúdo de proteínas totais 711,0mg/dL nas primeiras 24 horas de cultivo, com acréscimo de cerca de 2,3% em relação ao controle. As amostras tratadas com 1,0 mM e 2,0 mM de DBT apresentaram conteúdos de 589mg/dL e 637mg/dL, respectivamente, dados inferiores em relação a amostra controle, apresentando redução no conteúdo das proteínas cerca de 15% e 8,4%, respectivamente. Observou-se ao término do experimento que a amostra controle apresentou um decréscimo de cerca de 25,8% no conteúdo protéico em relação ao início do experimento. As amostras tratadas com 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de DBT apresentaram redução de cerca de 24,5%, 28,5% e 37%, respectivamente, do conteúdo de proteínas em relação às primeiras 24 horas de crescimento do microrganismo (Figura 1). Os resultados demonstram que em todas as condições estudadas o maior conteúdo de proteínas extracelulares foi observado nas primeiras 24 e 48 horas de crescimento, demonstrando maior atividade celular neste período.

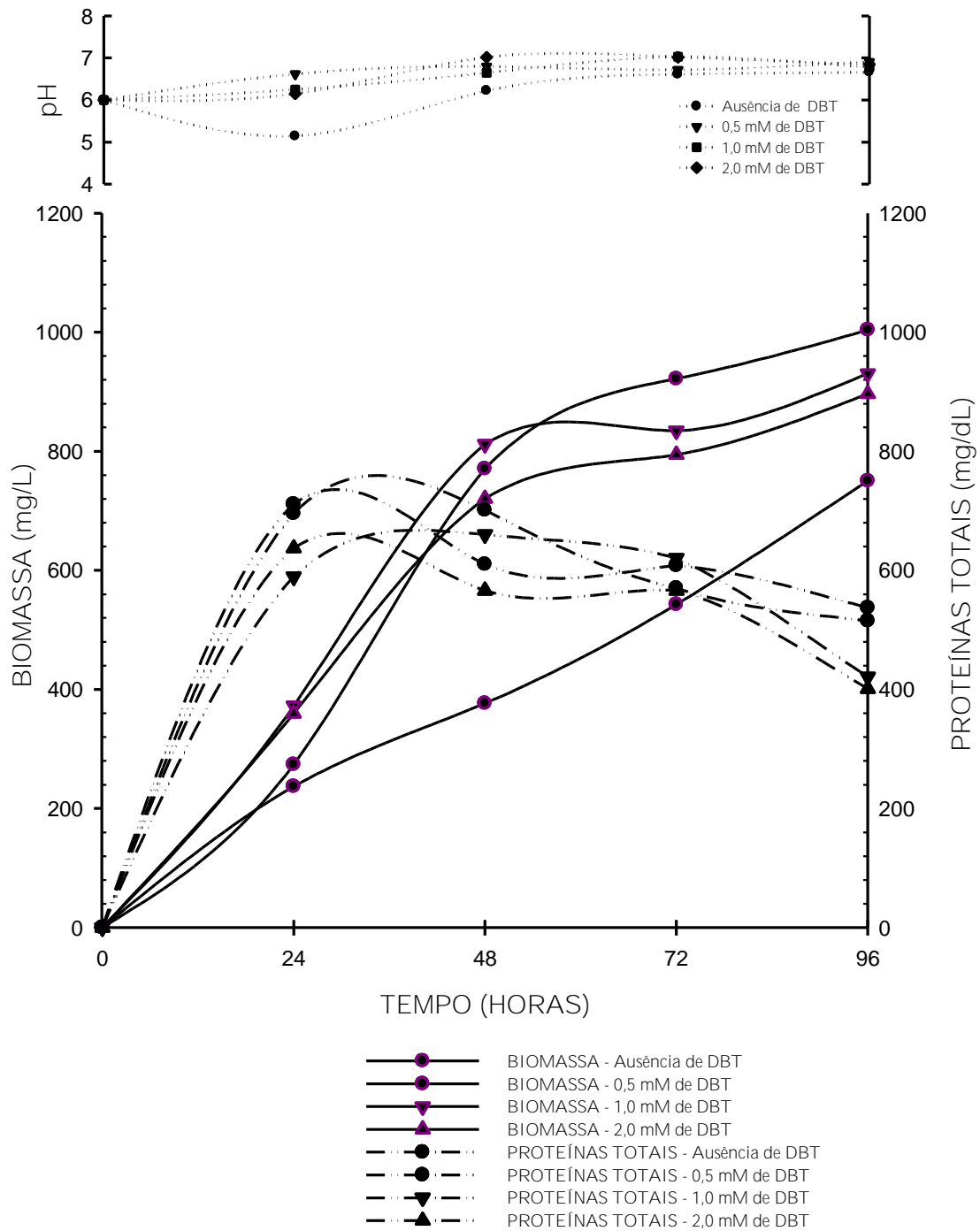


Figura 1. Curva de Crescimento de *Cunninghamella elegans* UCP-596. Determinação do pH, da biomassa e proteínas totais. *Cunninghamella elegans* cultivada em Sabouraud Líquido: sem dibenzotiofeno (controle) e com 0,50mM, 1,0mM e 2,0mM de dibenzotiofeno (tratados), à 28°C, 150 rpm, período de 96 horas.

3.2. Estudos Morfológicos

Fungos filamentosos 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, 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.

A amostra controle (Figuras 2A e 2A1) exibiu hifas desenvolvidas, bastante ramificadas, apresentando formação de ramificações primárias, delimitadas por um septo, com alta transparência. No entanto, não foi observado estrutura de resistência - clamidósporos.

A amostra tratada com 0,50mM de DBT (Figuras 2B e 2B1), apresentou hifas bastante desenvolvidas, espessas e densas, citoplasma homogêneo, hifas com uma intensa ramificação, com formação de ramificações primárias e secundárias, algumas ramificações estão delimitadas por septo na base, as ramificações são pouco desenvolvidas e apresentam diferentes formas: bifurcadas e bilaterais.

A amostra tratada com 1,0mM de DBT (Figuras 2C e 2C1), exhibe hifas com textura uniforme e com aumento de ramificações, porém pouco desenvolvidas, ramificações bilaterais, unilaterais e bifurcadas. Na Figura 2C1, ainda são observadas ramificações unilaterais, bilaterais e bifurcadas e uma protuberância bastante evidenciada, onde são emitidas quatro ramificações primárias, finas e longas partindo do mesmo ponto da hifa.

As amostras tratadas com 2,0mM de DBT (Figuras 2D e 2D1), apresentam hifas menos desenvolvidas, com intensas ramificações, pequenas, finas, enrugadas e bilaterais, sendo observado delimitações nas ramificações, sugerindo a presença de septos.

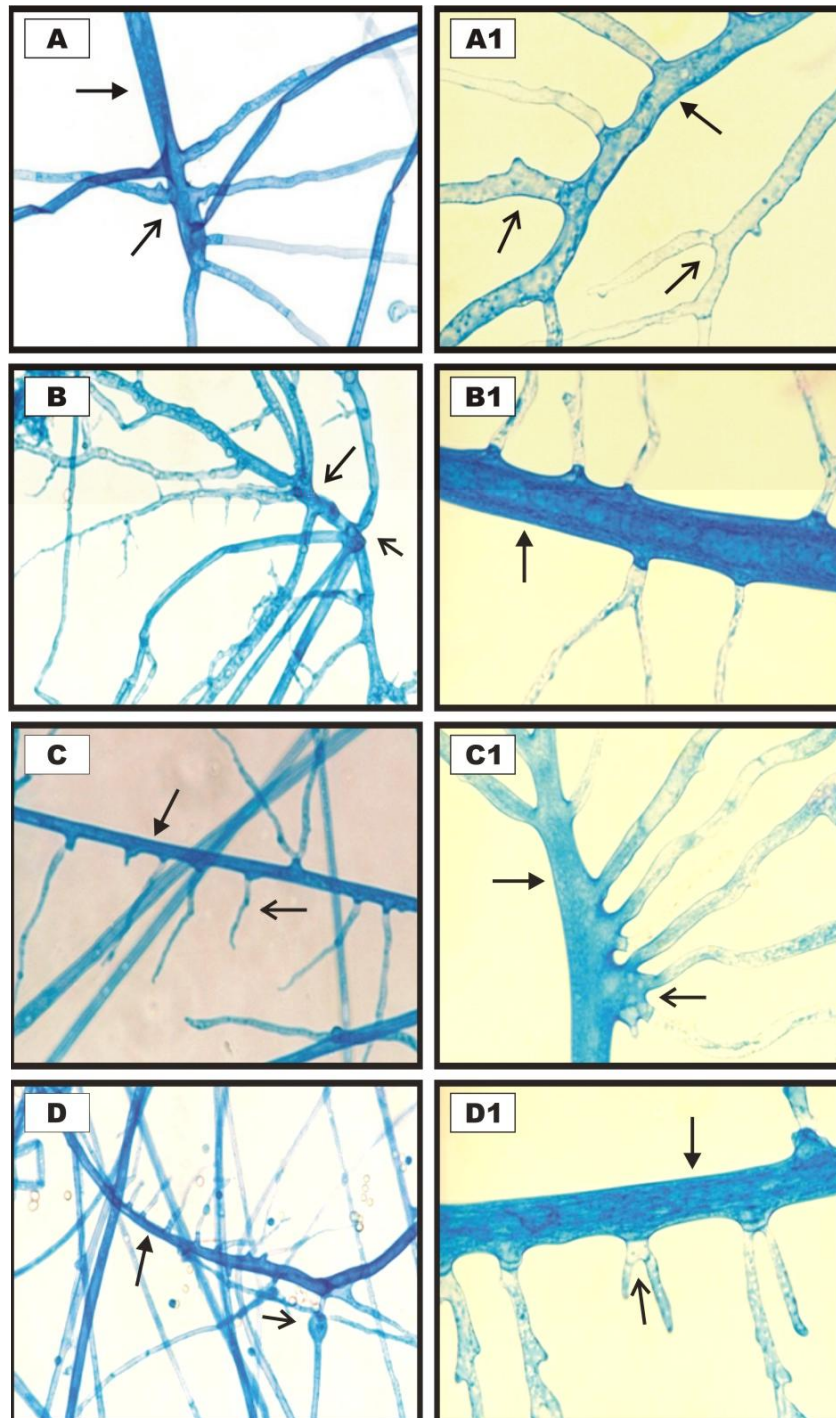


Figura 2. Padrões de Ramificações de *Cunninghamella elegans* UCP-596 em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Controle (A e A1), 0,50mM de DBT (B e B1), 1,0mM de DBT (C e C1) e 2,0mM de DBT (D e D1); Incubados à 28°C, no período de 24 e 48 horas: hifa ('), ramificações de hifas (g), aumento de 400X (A, B, C e D) e 1000X (A1, B1, C1 e D1).

Para identificar possível relação entre alteração de morfologia e a presença do DBT, foi realizado o estudo através da histoquímica para detecção de actina. A figura 3 (A – A1) apresenta hifas de *C. elegans* cultivadas em meio sem DBT, nas quais podem-se observar fluorescência delineando a parede celular, ao longo das hifas, bem como, marcação em forma de placas e filamentos no citoplasma e arranjos transversais ao eixo longitudinal da hifa. A análise das micrografias das hifas de *C. elegans* submetidas ao tratamento com 0,50mM de DBT, observada na figura 3 (B – B1), verifica-se diferenças em comparação com a cultura controle. A marcação fluorescente é observada na região citoplasmática associada à parede celular e essencialmente sob forma de grumos ao longo das hifas e também apresenta marcação em regiões de ramificação. O micélio de *C. elegans* crescido a 1,0mM de DBT estão apresentadas na Figura 3 (C – C1), notando-se uma intensidade da fluorescência, porém menor do que àquelas apresentadas no controle e tratado com 0,50mM de DBT. Pode-se observar discreta marcação ao longo da parede celular, sob a forma de pequenos grumos, e em pouca quantidade, bem como, filamentos delgados estão distribuídos irregularmente no citoplasma. Por outro lado, amostras tratadas com 2,0mM de DBT, podem ser observados nas Figuras 3 (D –D1), exibem marcação fluorescente delineando a parede celular dispostos uniformemente nas hifas e em suas ramificações, no citoplasma e também em clamidósporos, a marcação é observada sob a forma de grumos.

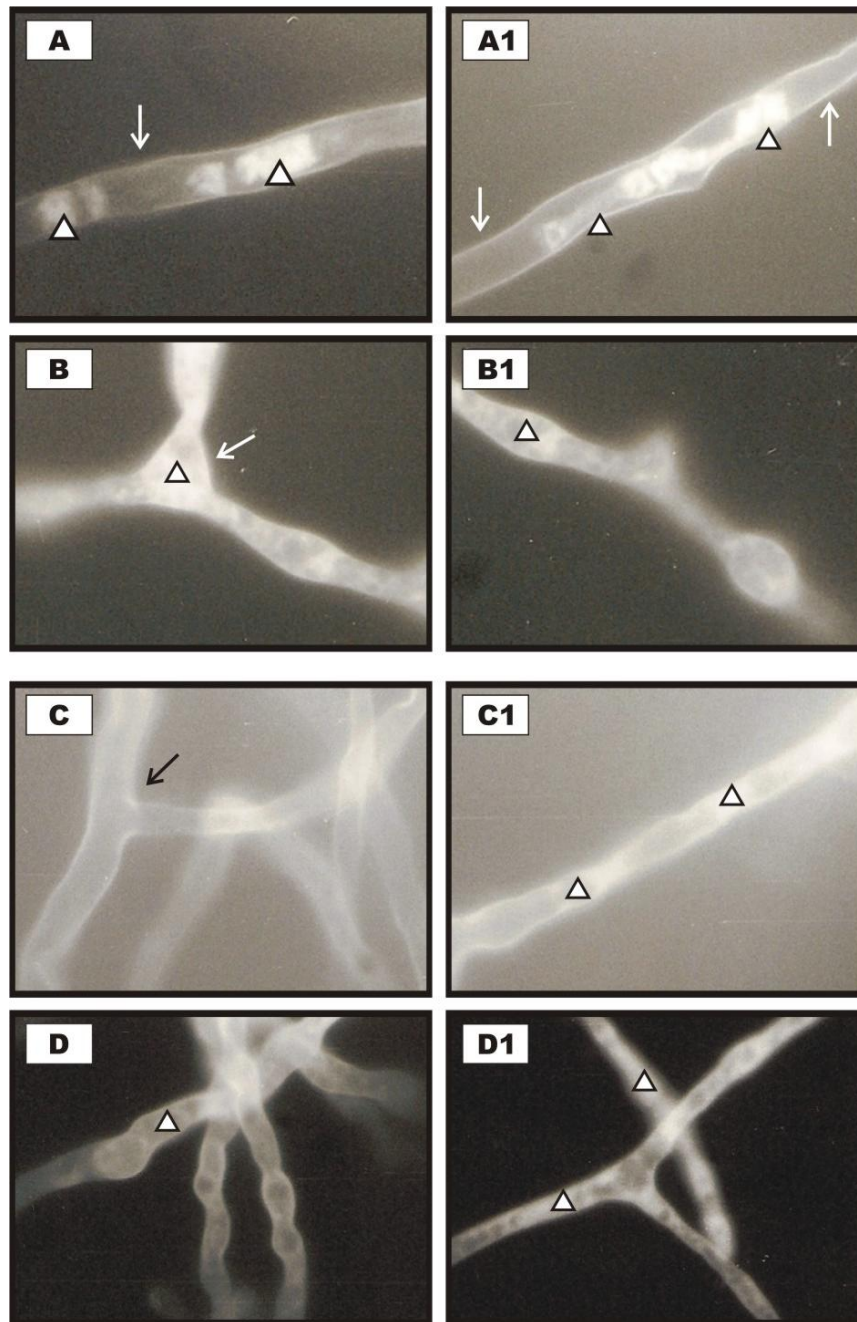


Figura 3. Microscopia de Fluorescência de *Cunninghamella elegans* (UCP-596), cultivada em meio de cultura Sabouraud líquido: Controle (A e A1); meio de cultura Sabouraud contendo 0,50mM (B e B1); 1,0mM (C e C1) e 2,0mM (D e D1) de dibenzotiofeno. Incubados à 28°C, 48 horas. Notar as diferentes formas de apresentação do citoesqueleto de actina, com aumento de 1000X. Filamentos e placas de actina em diferentes áreas das hifas (r), parede celular (g).

A ultraestrutura do micélio de *C. elegans*, cultura controle, coletada no período de 48 horas de crescimento, estão apresentados nas Figuras 4A e A1. A análise das micrografias exibe hifas com textura lisa e homogênea, largas e bastante eletrondensas, apresentando pequena quantidade de corpos densos e redondos. Por outro lado, o tratado com 0,50mM de DBT podem ser observadas nas figuras 4B e B1, apresentam hifas mais delgadas, mais ramificadas, com textura homogênea e com redução de eletrondensidade. Além disso, observou-se aumento de corpos celulares em formas variadas. As amostras cultivadas em meio Sabouraud líquido tratados com 1,0mM de DBT estão apresentadas nas figuras 4C e 4C1, demonstram hifas delgadas, com baixa eletrondensidade, bastante ramificadas; apresentando corpos densos de diferentes tamanhos e formas, contudo, o tratado com 1,0mM de DBT apresentou maior quantidade do que o tratado com 0,5mM. Com o tratamento de 2,0mM de DBT (Figuras 4D e D1) observam-se hifas mais eletrondensas, no entanto com eletrondensidade menor que o controle, e ainda, formação de hifas ramificadas, maior quantidade e aumento no tamanho dos corpos densos, resultando em um micélio totalmente alterado.

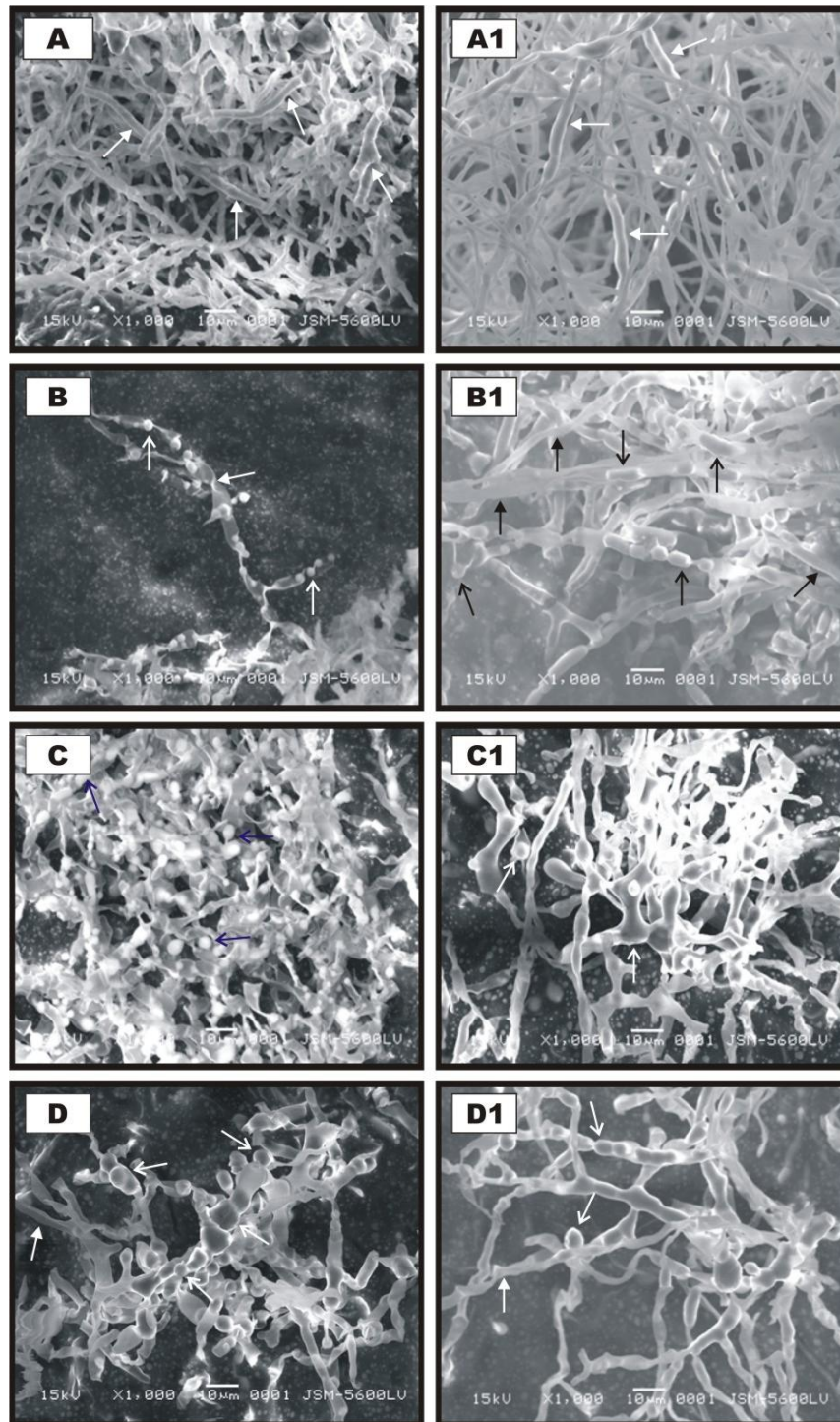


Figura 4. Eletronmicrografias de varredura de *Cunninghamella elegans* UCP-596, cultivada em meio de cultura Sabouraud líquido: Controle (A e A1); meio de cultura Sabouraud contendo 0,50mM (B e B1); 1,0mM (C e C1) e 2,0mM (D e D1) de DBT. Incubados à 28°C, 48horas. Corpus globosos (g); hifas ('). Aumento de 1000X.

4. Discussão

Os fungos, de um modo geral, são extremamente versáteis em suas respostas em função de variações ambientais. Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação e microelementos influenciam o metabolismo e conseqüentemente, o crescimento celular, a formação de estruturas reprodutivas e a diferenciação sexual (Garraway e Evans, 1984; Griffin, 1994; Aoki e Nirenberg, 1999; Kanauchi e Kukatsui, 1999; Kihara Et Al., 1999; Kitamoto et al., 1999; Tham et al., 1999).

Respostas celulares relacionadas às condições ambientais, bem como, comportamentos fisiológicos de microrganismos, em presença de compostos xenobióticos, podem resultar na indução de alterações intracelulares relacionadas com o fenômeno de oxi-redução.

Neste trabalho, o fungo *C. elegans* UCP 596 foi crescido em meio de cultura Sabouraud, contendo 40g/L de glicose, como fonte de carbono e foram adicionadas três concentrações de DBT. Podemos observar nos resultados que toda a fonte de carbono foi utilizada nas primeiras 24 horas de crescimento. No entanto, o crescimento do fungo no meio de cultura Sabouraud com DBT apresentou maior produção de biomassa em relação às amostras crescidas em meio Sabouraud sem DBT, amostras controle. Sugerindo a ocorrência do fenômeno de diauxia, nas amostras tratadas com DBT, onde o microrganismo utiliza completamente a fonte de carbono, glicose no período de 24 horas de crescimento e posteriormente utiliza o DBT, como segunda fonte de carbono, para auxiliar no desenvolvimento e manutenção celular.

A utilização de compostos orgânicos contendo enxofre em fungos é extritamente dependente da presença de glicose no meio de cultura (Baldi et al., 2003). O isolado *Rhodosporidium toruloïdes* DBVPG 6662 crescido em altas concentrações de DBT (5,67mg/mL), em presença de glicose utilizando-a como fonte de carbono e o DBT como fonte de enxofre. Os

metabólitos formados foram 5,5-dióxido DBT e ácido benzenosulfônico, bifenil, fluorene e o solvente N,N- dimetilformamida (Baldi et al., 2003).

O pH inicial no meio de cultura Sabouraud foi 6,0. O controle apresentou pH 5,14, em 24 horas de cultivo, seguindo de um aumento progressivo para pH 6,6 ao término do cultivo. A amostra crescida em 0,5 mM apresentou pH 6,62, maior pH observado nas primeiras 24 horas de cultivo, adicionalmente atinge pH 6,9 ao término do experimento. As amostras tratadas com 1,0 mM e 2,0 mM de DBT, pH 7,0 no período de 72 horas, 6,7 e 6,8, respectivamente, em 96 horas de cultivo. O efeito do pH para crescimento celular e atividade de dessulfurização de DBT por *Gordonia* sp. CYKS1, foi investigado e o melhor resultado observado para crescimento celular e atividade de desulfurização, foi observado no pH 7 – 8 (Kim et al., 2004).

As alterações no padrão de ramificação das hifas de *C. elegans* estão diretamente relacionadas à concentração do dibenzotiofeno no meio de cultivo. As alterações morfológicas observadas neste trabalho, como: aumento no número de ramificações, modificação na forma, tornando-se mais curtas, delgadas, bifurcadas, bilaterais ou unilaterais, bem como, o aparecimento de protuberância na base da ramificação primária estão relacionados com a estratégia de sobrevivência de *C. elegans*, provavelmente para captação de nutrientes a fim de suprir as condições limitantes mediadas pelo estresse causado pelo dibenzotiofeno.

A distribuição de organelas ao longo do comprimento da hifa, apresenta uma nomenclatura única: a região ou zona apical, caracterizada pelo acúmulo de vesículas citoplasmáticas; a região subapical, rica em organelas e apresentando o citoplasma com distribuição homogênea; e a região distal, que se apresenta vacuolizada. A medida que a hifa envelhece a parede celular tende a se tornar mais espessa, a vacuolização intensifica-se, ocorre o acúmulo de lipídeos e o volume citoplasmático diminui, a ponto de vacúolos tomarem completamente o interior da hifa (Harold, 1990).

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., 1996). 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). Os sítios de ligação do marcador faloidina FITC aparecem como estruturas de alta fluorescência. A superfície celular dos fungos é composta por três matrizes contíguas e interconectadas: componentes capsular ou exocelular, parede celular e membrana plasmática. A bicamada lipídica é composta de fosfolipídeos e quantidade substancial de proteínas e esteróis (Griffin, 1994).

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 no citoesqueleto poderiam culminar com modificações no crescimento e na morfologia micelial (Shari'a et al., 1999; Bartnicki-Garcia et al., 2000; Heath et al., 2000).

A utilização da ultraestrutura como uma ferramenta para compreender melhor a estrutura dos fungos, tem contribuído com a área de micologia. Por meio de microscopia eletrônica é possível observar a organização e constituição da parede celular dos fungos. Considerando a importância dos aspectos estruturais na célula em respostas às condições ambientais a microscopia eletrônica de varredura é utilizada para avaliar o comportamento em *C. elegans* na

presença de DBT. Foi possível observar diferenças na estrutura de *C. elegans* relacionados a aspectos morfológicos, eletrondensidade celular, e presença de corpos eletrondensos no interior da célula. A estrutura celular é influenciada pela presença do DBT. As alterações estão diretamente associadas ao aumento na concentração do composto. Considerando que o DBT é um composto recalcitrante ao ambiente, e em altas concentrações tóxico para os seres vivos. As alterações celulares observadas neste trabalho estão relacionadas à presença de numerosos corpos eletrondensos no interior das hifas, apresentando-se em diferentes formas e tamanhos. Assim como, a redução da densidade nas hifas também é evidente e maiores ramificações são também observadas nas hifas.

5. Conclusões

O isolado de *C. elegans* UCP-596 apresenta habilidade de crescer em presença de dibenzotiofeno nas concentrações de 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM.

C. elegans apresenta maior crescimento nas amostras tratadas com DBT, resultado que sugere o fenômeno de diauxia, utilização do DBT como segunda fonte de carbono pelo fungo.

O isolado de *C. elegans* UCP-596 apresenta maior produção de biomassa quando cultivado no meio de cultura Sabouraud na concentração 0,5mM de DBT.

O dibenzotiofeno induz variações na morfologia celular do isolados *C. elegans* UCP 596 em presença das concentrações de 0,50 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de DBT, analisado por microscopia óptica.

A marcação de filamentos de actina observados por microscopia de fluorescência revela que a distribuição (no citoplasma e na parede celular), forma (de filamentos e/ou grumos), e intensidade de marcação destes filamentos são influenciadas pela presença do dibenzotiofeno.

O dibenzotiofeno induz o surgimento de inúmeros corpos globosos e densos distribuídos por toda a hifa, variações associadas à textura e eletrondensidade das hifas, aumento da quantidade de ramificações em *C. elegans* (UCP – 596), observados por microscopia eletrônica de varredura.

Agradecimentos

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

Referências

- Abbad-Andaloussi, S., Warzywoda, M. e Monot, F., 2003. Microbial Desulfurization of Diesel Oils by Selected Bacterial Strains. *Oil e Gas Science and Technology*. Ver. IFP. 58 (4), 505 –513.
- Alexopoulos, C. J, Mims, C. W., Blackwell, M., 1996. *Introductory Mycology*. New York, Jonh Wiley e Sons publishers.
- Aoki, J. e Nireuberj H. I., 1999. *Fusarium globosum* from Subtropical Japan and the Effect of Different Light Conditions on its Conideogenesis. *Mycoscience*, Tóquio, 40, 1-9.
- Ambrósio, S. T. e Campos Takaki, G. M., 2004. Decolorização of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* (UCP-542) under co-metabolic conditions. *Bioresource Technol.*, 91, 69 – 75.
- Baijal, U., Mehrotra, B. S., 1980. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. *Sydowia*. 33, 1 – 13.
- Baik, W.Y., Bae, J. H., Cho, K. M., Hartmeier, W., 2002. *Bioresource Tecnol.*, 81, 167-170.
- Baldi, F., Pepi, M. e Fava, F., 2003. Growth of *Rhodosporidium toruloides* Strain DBVPG 6662 on Dibenzothiophene Crystals and Orimulsion *Appl Environ Microbiol.*, 69(8). 4689–4696.

- Bartnicki-Garcia, S., Nelson N., Cota Robles, E., 1968. Electron Microscopy of Spore Germination and Cell Wall Formation in *Mucor rouxii*. Archives of Microbiology. 63, 242 - 255.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P. e Cerniglia, C. E., 1996. Initial Oxidation Products in the Metabolism of Pyrene, Anthracene, Fluorene, and Dibenzothiophene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol., 2554 – 2559.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. 1996. Tokyo, Academic press. The Fungi.
- Cervantes e Gutierrez-Corana, 1994. Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi. Microbiol.Ver. 14, 121 – 138.
- Crawford, D. e Gupta, R. K., 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. Curr. Microbiol., 21, 229 – 231.
- Da Cunha, C. D., 1996. “Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil.
- De Souza, W., 2000. Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro.
- Donald, L., Crawford e Rajinder, K. Gupta, 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. Curr. Microbiol., 21, 229-231.

- Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M., 2006. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere*. 64, 408 – 414.
- Endo, A., Takeshima, H. e Kuwabara, K., 1985. Acetil CoA Carboxylase Inhibitors From the Fungus *Gongronella butleri*. *The Journal of Antibiotics*, XXXVIII, 599 – 604.
- Foster, B. C., Lister, D. L., Zamecnik, J., Coutts, R. T., 1991. The biotransformation of tranlycypromine by *Cunninghamella equinulata*. *Can. J. Microbiol.*, 37, 791 – 795.
- Garraway, M. O. e Evans, R. C., 1984. *Fungal Nutrition and Physiology*. John Willey e Sons Incorporation publishers. p. 401, 1984.
- Griffin, D. H., 1994. *Fungal Physiology*. John Willey e Sons Incorporation Publishers. p.458.
- Gunam, I. B. W., Yaku, Y., Hirano, M., Yamamura, K., Tomita, F., Sone, T., e Asano, K., 2006. Biodesulfurization of Alkylated Forms of Dibenzothiophene and Benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b. *J. Biosc. Bioengin.*, 101 (4), 322 – 327.
- Heath, I. B., 1990. The roles of actin in tip growth of fungi. *International Reviews of Cytology*. 123, 95 - 127
- Herrera, T., Ulloa, M., 1998. *El Reino de los Hongos (micología básica y Aplicada)*. (2ª ed).

- Kana-Uchi, A e Kukatsui, T., 1999. Light Induced Fruit Body Formation of the Entomogenous Fungus *Paecilomyces termipes*. *Mycoscience*, 40, 349-351.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technol.*, Inglaterra. 53, 195 – 206.
- Kihara, J., Watanabe, Y., Honda, Y., 1999. Suppression and Reactivation of UV-Induced Sporulation by Blue Light in *Bipolaris oryzae*. *Mycoscience*, 40, 363-366.
- Kim, Y. J., Chang, J. H., Cho, K., Ryu, H. W. e Chang, Y. K., 2004. A Physiological Study on Growth and Dibenzothiophene (DBT) Desulfurization Characteristics of *Gordonia sp.* CYKSI. *Korean J. Chem. Eng.* 21(2), 436 – 441.
- Kitamoto, Y., Akita, K., Horikoshi, T., 1999. Effects of High-Temperature Treatment on Two Essential Light Processes and an Intervening Dark Process in Photoinduced Pileus Primordium Formation of a Basidiomycete, *Favolus arcularius*. *Mycoscience*, Tóquio, 40, 103-108.
- Li, L. F., Xu, P., Ma, C. Q., Luo, L. L., Wang, X. S., 2003. Deep Desulfurization of Hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium sp.* X7B. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223, 301 – 307.

- Mahony, T. O', Guibal, E, Tobin, J. M., 2002. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enz.Microb. Technol.*, 31, 456 – 463.
- Mendes-Giannini, M. J.e Melhem, M.S.C. Fungos. *In: Ferreira WE, Souza S, Ávila SLM* (coords) Diagnóstico das principais doenças infecciosas e Autoimunes. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, (2^a.ed.), 2001.
- Oliveira, F. J. S., 2001. “Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, p. 110.
- Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F. E., Cerniglia, C. E., 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3654 – 3659.
- Pothuluri, J. V., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Fu, P. P., Cerniglia, C. E., 1998. Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. *J. Toxic. Environ. Health*, 53, 153 – 174.
- Pothuluri, J. V., Sutherland, J. B., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E., 1998. Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3106 – 3109.
- Reddy, C. S., Acosta, D., Davis, P. J., 1991. Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its O-alkyl homologues with *Cunninghamella* species. *Xenobiotica*. 20, 1281-1297.

- Romero, M. C., Hammer, E., Hanschke, R., Arambarri, A. M. e Schauer, F., 2005. Biotransformation of biphenyl by the filamentous fungus *Talaromyces helicus*. World J. Microbiol. e Biotechnol., 21, 101 – 106.
- Schwartz, H., Liebig Weber, A., Hochstatter, H., Bottcher, H., 1996. Microbial oxidation of ebastine. Appl. Environ. Microbiol., 44, 731 – 735.
- Jong-Su, S., Young-Soo, K., Il Kyu Cho, Qing X. Li, 2006. Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter sp.* P1-1. Intern. Biodet. Biodeg., 58 (1), 36 - 43.
- 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). Bol. Micol., 14, 1 - 7.
- Tham, L., X., Matsushashi, S., Kume, T., 1999. Growth and Fruit Body Formation of *Gracioderma lucidum* on Media Supplemented with Vanadium, Selenium and Germanium. Mycoscience, Tókió, 40, 87-92.
- Tombs, M. P. e Blake, G. G., 1982. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. Bioch. Bioph. Acta, 700, 81 – 89.
- Van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J. e Truper, H.G., 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium sp.* Arch. Microbiol., 153, 324 – 328.

Volesky, B., Holan, Z. R., 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* Washington, 11, 235 – 250.

Zhang, D., Freeman, J. P., Sutherland, J. B., Walker, A E., Yang, Y., Cerniglia, C. E., 1996a. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 798 - 803.

TERCEIRO ARTIGO

Efeito do Dibenzotiofeno na Ultraestrutura de
Cunninghamella elegans

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico
Microscopy and Microanalysis

Efeito do Dibenzotiofeno na Ultraestrutura de *Cunninghamella elegans*

Souza, P. M.^{1,4}; Marinho, P. H.^{2,4}; Lima, M. A. B.^{1,4}; Moura, G. F.^{3,4} Nascimento, A. E.^{4,5};
Campos-Takaki, G. M.^{4,6}

¹Pós-Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

²Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE – Brasil; ³Graduação em Nutrição – Faculdade Maurício de Nassau, Recife, PE – Brasil;

⁴Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

⁵Departamento de Biologia - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil;

⁶Departamento de Química - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil.
tyttams@hotmail.com

Resumo

Inúmeros xenobióticos induzem modificações na bioquímica/fisiologia e na morfologia de células procarióticas e eucarióticas, acarretando variações no comportamento celular. Dessa forma, informações sobre o comportamento ultraestrutural são importantes ferramentas na elucidação dos mecanismos adjacentes à adaptação celular na presença de agentes recalitrantes. Neste trabalho, a análise ultraestrutural do isolado de *Cunninghamella elegans* crescido em presença do dibenzotiofeno foi realizada utilizando-se os métodos de rotina e a citotoquímica enzimática para catalase, por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados obtidos com a técnica de rotina permitiram verificar alterações na estrutura fina das hifas, como por exemplo, variações na textura, eletrondensidade citoplasmática, número de corpos eletrondensos e mitocôndrias. Adicionalmente, a citotoquímica para catalase revelou variações na intensidade e distribuição dos produtos de reação na parede celular, no citoplasma e mitocôndrias. A marcação em mitocôndrias está bastante evidente na amostra controle. Tais modificações estão diretamente relacionadas à concentração do DBT. Os resultados obtidos fornecem informações importantes acerca do efeito do xenobiótico sobre a estrutura fina de *Cunninghamella elegans*.

Palavras-chave: Catalase; Citoquímica; *Cunninghamella elegans*; Dibenzotiofeno; Ultraestrutura.

1. Introdução

O teor de enxofre nos combustíveis é uma preocupação ambiental porque este elemento é convertido a SO_x durante a combustão, que contribui para formação da chuva ácida (Kopac, 1999). Nas grandes cidades, por exemplo, cerca de 40% da poluição do ar resultam da queima de gasolina e óleo diesel pelos veículos automotores, responsáveis pela emissão de monóxido e dióxido de carbono (CO_x), óxidos de nitrogênio (NO_x), dióxido de enxofre (SO₂), derivados de hidrocarbonetos (HC) e chumbo (Lee et al., 2002; King e Li, 2006).

Os compostos orgânicos de enxofre estão geralmente presentes em quase todas as frações de destilação do petróleo. De acordo com Song e Ma, 2003, existem três tipos principais de combustíveis de transporte: a gasolina, o óleo diesel e o querosene de aviação, que têm diferentes composições e propriedades. Dentre os tipos comuns de compostos contendo enxofre nos combustíveis de transporte estão, por exemplo, mercaptanas; sulfetos e dissulfetos; tiofeno e seus derivados alquilados, benzotiofeno e o dibenzotiofeno.

O dibenzotiofeno é considerado um composto modelo para estudos de dessulfurização biológica de combustíveis fósseis e em estudos de compostos S-heterocíclicos persistentes no ambiente (Yamada et al., 1968; Spies et al., 1987; Li et al., 2003). Dessa forma, vários microrganismos têm sido avaliados quanto à habilidade de remoção bioquímica do enxofre presente na molécula de DBT (Van Afferden et al., 1990; Faison et al., 1991; Kilbane, 1991; Kilbane e Jackowski, 1992; Omori et al., 1992, Jia et al., 2006, Mohebalí et al., 2006, Yu et al., 2006).

As bases fisiológicas e bioquímicas que conduzem a eficiência do processo de dessulfurização não estão elucidadas, sendo relatadas na literatura algumas das vias enzimáticas

que atuam durante o processo. Contudo, é sabido que as respostas enzimáticas dependem da ativação de mecanismos celulares associados ao comportamento celular.

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado para avaliar as respostas ultraestruturais, elucidadas com o crescimento na presença do DBT, de *C. elegans*, um Zygomycete modelo para estudos de biodegração e biotransformação de agentes recalcitrantes.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e Condição de Cultivo

O fungo *Cunninghamella elegans* (UCP-596) isolado de sedimento do manguezal do rio Formoso, Rio Formoso, Pernambuco, mantido no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco foi utilizado. O organismo foi repicado no meio de cultura Batata Dextrose e Agar (BDA) para produção de esporos e incubado a 28°C por 6 dias. Após este período, um total de 10^7 esporos/mL foram coletados e inoculados no Meio de cultura Sabouraud Líquido (SAB), contendo: Glicose (40g), Peptona (10g) acrescido de dibenzotiofeno nas concentrações de 0,50mM, 1,0mM e 2,0mM e incubados à 28°C sob agitação orbital de 150 rpm por 96 horas. Amostras controle foram crescidas no meio SAB sem DBT nas mesmas condições descritas acima. A solução estoque de dibenzotiofeno utilizada neste trabalho foi preparada com dimetilformamida na concentração de 1 M (p/v). O micélio coletado no período de 48 horas de cultivo foi submetido aos estudos ultraestruturais descritos a seguir.

2.2. Estudos Ultraestruturais

2.2.1. Técnica de Rotina (De Souza, 2000)

As amostras coletadas no período de 48 horas de cultivo foram lavadas em PBS, pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a etapa de fixação, todas as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes durante 10 minutos. Seguir-se-á a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora, temperatura ambiente, 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% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). O processo de embebição ocorreu com o uso de 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 à ultramicrotomia, para obtenção de cortes ultrafinos, os quais foram depositados em grades de cobre com 200 Mesh. As grades contendo as amostras foram observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

2.2.2. Citoquímica Enzimática para Catalase (Robinson e Karnovsky, 1983)

As amostras coletadas no período de 48 horas de cultivo foram lavadas por duas vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose. Após essa etapa as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose, durante 1 hora, a temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas em tampão

cacodilato 0,1M, pH 7,2, contendo 5% de sacarose por 2 vezes. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão tris-HCl 0,05M, pH 9,0, contendo 5% de sacarose e incubadas a 37°C, por 1 hora em solução contendo 20mg de diaminobenzidina, 10mL de tampão tris-HCl 0,05M, pH9,0. Posteriormente, foram incubadas em 20mg de diaminobenzidina, 9,8mL de tampão tris-HCl (0,05M), pH 9,0 e 0,2mL de peróxido de hidrogênio 1,0%, a 37°C, por 4 horas. Em seguida, foram novamente lavadas em tampão tris-HCl (0,05M), pH9,0, contendo 5% de sacarose e novamente lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pH7,2, contendo 5% de sacarose e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,0% em tampão cacodilato 0,1M, pH7,2, durante 1 hora, temperatura ambiente. Após este intervalo as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pH7,2, contendo 5% de sacarose, por duas vezes. Posteriormente as amostras foram desidratadas, embebidas, submetidas a microtomia e análise no microscópio JEOL CX100, operando a 80kV.

3. Resultados

Os resultados obtidos para a análise por microscopia eletrônica de transmissão com o uso da técnica de rotina estão apresentados na figura 1. As amostras controle exibem citoplasma homogêneo, várias mitocôndrias e presença de corpos lipídicos em diferentes formas e tamanhos. A parede celular apresenta-se delgada e eletrondensa. Grânulos eletrondensos são visualizados na área de intenso crescimento celular (Figura 1 - A e A1).

A amostra tratada com 0,50 mM de DBT apresenta um aumento no número e tamanho de corpos lipídicos dispersos no citoplasma, presença de vacúolo. Adicionalmente, há uma redução na eletrondensidade da parede celular. Pode-se observar intensa distribuição de granulação eletrondensa na parede celular e na extremidade da hifa, onde ocorre o crescimento celular, bem como na região da membrana citoplasmática (Figura 1 - B e B1).

Amostras tratada com 1,0 mM apresenta parede celular delgada, com baixa eletrondensidade; presença de núcleo na hifa; grânulos eletrondensos, observados ao longo da membrana citoplasmática e parede celular; vacúolo e corpos lipídicos são exibidos em diferentes formas e tamanhos (Figura 1 - C e C1).

Amostras tratada com 2,0 mM de DBT, parede celular eletrondensa e inúmeros grânulos são observados nas suas diferentes camadas, bem como na região da membrana citoplasmática. Presença de corpos lipídicos é observada (Figuras 1 - D e D1).

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 DBT. Variações relativas a eletrondensidade da parede celular, vacuolização e a presença de corpos lipídicos foram visualizadas neste estudo.

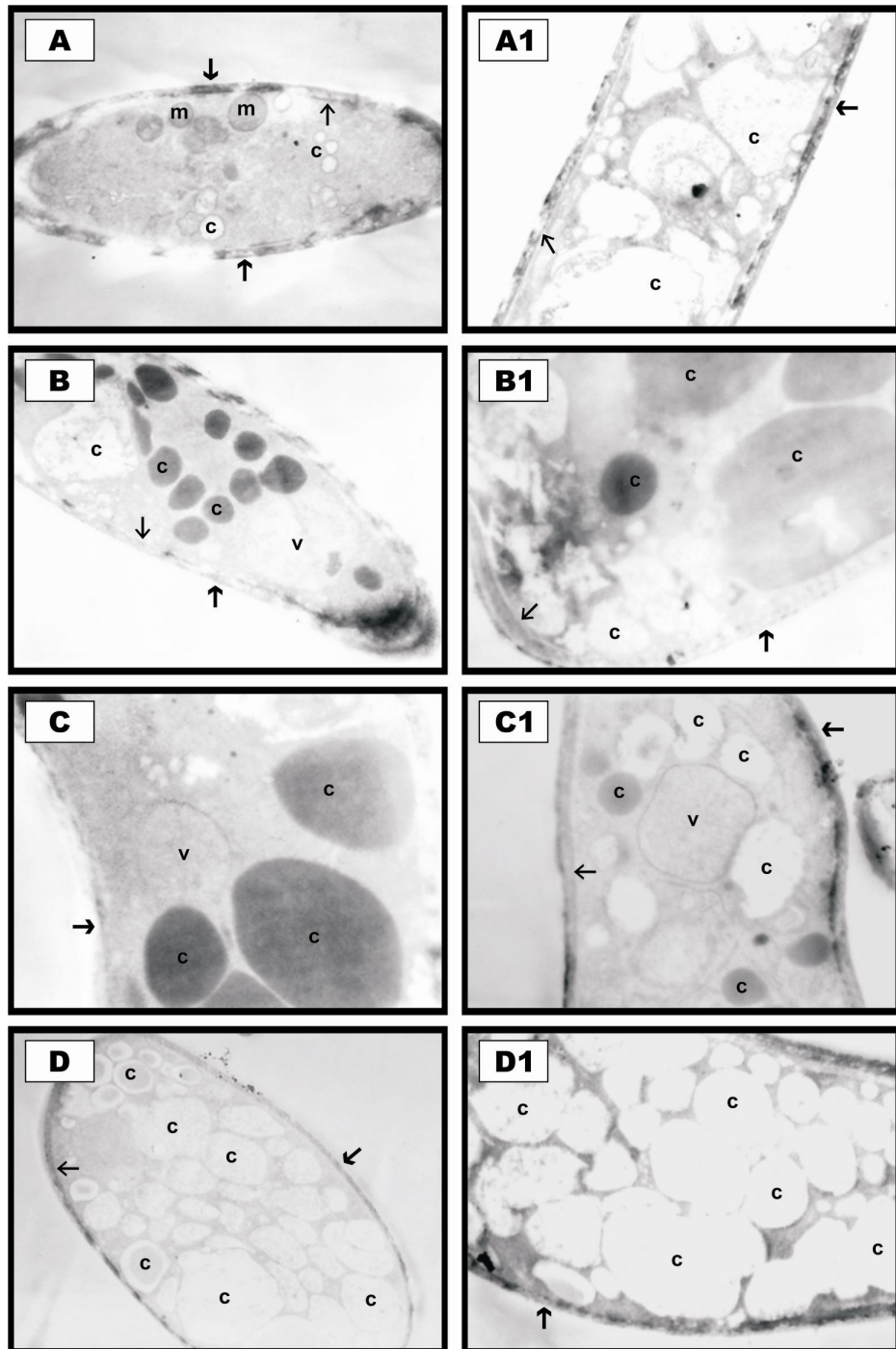


Figura 1. Eletronmicrografia de *Cunninghamella elegans* UCP-596, em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Técnica de Rotina. Controle (A e A1), aumento de 14.000X; 0,5mM de DBT (B e B1), aumento de 14.000X, 1,0mM de DBT (C e C1), aumento de 27.000X e 20.000X respectivamente; e 2,0mM de DBT (D e D1), aumento de 5.000X e 14.000X, respectivamente. Mitochondrias (m), Vacúolos (V), Corpos Lipídicos (C), Parede Celular (â), Membrana Citoplasmática (ũ).

Análise citoquímica para catalase exibiu variações na produção de catalase e na localização dos produtos de reação formados, no isolado *C. elegans* em presença de diferentes concentrações de DBT. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2.

A figura 2 (A e A1) exhibe hifas da cultura controle. O uso do marcador permite observar a presença de produtos de reação citoquímica em maior quantidade na parede celular e mitocôndrias, menor quantidade no citoplasma. 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.

Hifa cultivada em presença de 0,50 mM de DBT apresenta grande quantidade de produtos de reação no citoplasma e na superfície celular Figura 2 (B e B1). No entanto, a hifa tratada com 1,0 mM de DBT exhibe intensa marcação na superfície da parede celular e na região do citoplasma próximo a membrana citoplasmática Figura 2 (C e C1).

A figura 2 (D e D1) apresenta células expostas a 2,0 mM de DBT. Nota-se intensa deposição de produtos de reação na parede celular e no citoplasma. Adicionalmente, há discreta marcação em mitocôndrias.

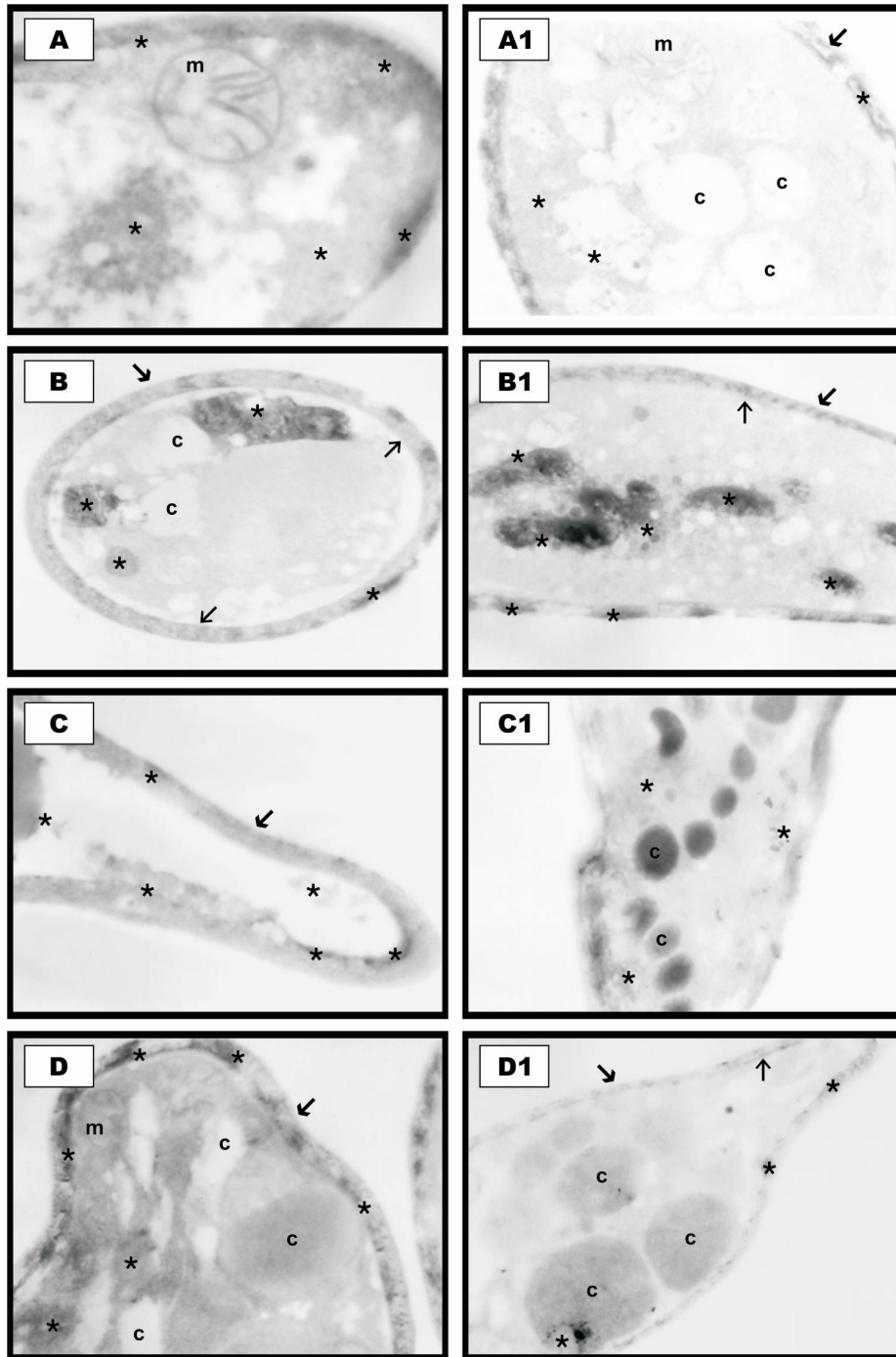


Figura 2. Eletronmicrografia de *Cunninghamella elegans* UCP-596, em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar. Citoquímica para Catalase. Controle (A e A1), aumento de 40.000X e 27.000X, respectivamente; 0,5mM de DBT (B e B1), aumento de 20.000X e 27.000X, respectivamente; 1,0mM de DBT (C e C1), aumento de 20.000X e 27.000X, respectivamente; e 2,0mM de DBT (D e D1), aumento de 27.000X e 14.000X, respectivamente: Núcleo (N), Mitochondrias (m), Vacúolos (V), Corpos Lipídicos (C), Parede celular (â), Membrana Citoplasmática (Ú), Produtos de Reação (á).

4. Discussão

Os fungos são de grande interesse biotecnológico, pela sua marcante versatilidade metabólica, característica que permite o seu desenvolvimento em condições ambientais adversas e faz dos fungos importantes agentes na remediação de áreas contaminadas com xenobióticos (Griffin, 1994; Bononi, 1998; Rajapaksha et al., 2004; Gemma, 2006).

Os estudos relacionados à ultraestrutura podem ser utilizados para permitirem a elucidação do comportamento celular em diferentes condições. A microscopia eletrônica tem sido utilizada para determinação de caracteres morfológicos, bem como para a análise do comportamento celular de diferentes organismos, o que resulta em informações que podem ser associadas a aspectos genéticos, fisiológicos e bioquímicos ampliando o conhecimento sobre o metabolismo celular (Hollenberg e Erickson, 1973; Takeo et al., 1989; Klomprens, 1990; Mims, 1991; Maia et al., 1993; Saikawa e Katsurashima, 1993; Edelman e Kloprens, 1995a, 1995b; Jones et al., 1996; Mckeown et al., 1996).

Sabe-se que o processo de crescimento/diferenciação celular está intimamente associado a modificações químicas e estruturais na organização da célula, as quais funcionam como marcadores para os diferentes estágios de maturação de um organismo. Inúmeros fatores influenciam a morfologia/ultraestrutura de microrganismos. Variações na composição química em função da composição do meio, da idade celular, e do estágio metabólico resultam em modificações na morfologia e estrutura fina dos fungos (Smith et al., 1977; Garraway e Evans, 1984; Griffin, 1994; Rivero e Cerdá-Olmedo, 1994).

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, revelando os mecanismos de adaptação celular a presença de agentes recalcitrantes.

Cunninghamella elegans Lendner 1905, tem sido indicada por muitos autores como um fungo modelo capaz de metabolizar uma ampla variedade de compostos recalcitrantes (Zhang, 1996, Ambrósio e Campos-Takaki, 2004), 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 (Cerniglia e Gibson, 1977, Shiosaki et al., 2001), e na biorrecuperação de metais pesados (Franco et al., 2004, Souza et al., 2005).

Neste trabalho foi empregado o método de rotina para microscopia eletrônica de transmissão que permitiu detectar variações na ultraestrutura de *C. elegans* em função da presença do DBT. Variações associadas a eletrondensidade da parede celular e membrana citoplasmática podem alterar a estrutura celular e conseqüentemente a permeabilidade da membrana citoplasmática. O aumento no número de corpos eletrondensos no interior da hifa são observados de acordo com o acréscimo da concentração de DBT no meio de cultura, produzindo alterações na forma, arranjo celular, alterações associadas a vacuolização e condensação do citoplasma. Dados confirmados com literatura para compostos recalcitrantes, como metais pesados e compostos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e demonstrando pela primeira vez o efeito do dibenzotiofeno na ultraestrutura de *C. elegans*.

A citoquímica ultraestrutural gera informações sobre a localização *in situ* de moléculas, permitindo a associação entre as diferentes atividades bioquímicas de qualquer tipo celular. Os resultados obtidos com a citoquímica combinados com dados obtidos por outras metodologias conduzem a elucidação das funções, atividades e estado metabólico de diferentes compartimentos celulares (De Souza, 1989; Alberts et al., 1996). Através da microscopia eletrônica tornou-se possível a análise de proteínas/enzimas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, conseqüentemente, informações adicionais foram geradas, as quais associadas a bioquímica, a

genética e a fisiologia introduziram novas perspectivas quanto ao funcionamento da célula fúngica. A localização, quantificação e distribuição subcelular de inúmeros tipos moleculares, bem como suas atividades "*in situ*" podem ser avaliadas através de técnicas citoquímicas através da microscopia eletrônica de transmissão (Klomprens, 1990).

Existe uma variedade de microrganismos que podem viver sob condições ambientais adversas como altos e baixos níveis de pH, temperatura e salinidade. Tais organismos possuem específicos mecanismos para sobreviver nestes ambientes. Relatos associados a respostas celulares em presença de estresse produzido pelo dibenzotiofeno são inexistentes (Lourenço e Felisbino, 2001, Tanaka e Ueda, 1993, Carlile et al., 2004).

Os efeitos debilitantes do estresse físico e químico que sofre as células microbianas estão bem documentados, bioquimicamente e molecularmente, sugerindo que as células alteradas, mas viáveis foram modificadas fisiologicamente. O estudo relativo à resposta ao estresse oxidativo é essencial para o entendimento da fisiologia celular em função de estímulos ambientais, resultando em um mecanismo de defesa fundamental na presença de agentes recalcitrantes. Embora os mecanismos de adaptação de microrganismos a ambientes submetidos a alto estresse oxidativo não estejam totalmente elucidados, postula-se que enzimas como a catalase possam estar envolvidas na eliminação da toxicidade de inúmeros xenobióticos (Deisseroth et al., 1970, Bravo et al., 1997, Loewen, 1997).

A Catalases podem ser encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Embora, não seja essencial para o crescimento e a sobrevivência de microrganismos sob condições laboratoriais, tais enzimas são fundamentais para a sobrevivência em inúmeras situações de estresse ambiental, as células sintetizam a catalase em resposta a condições ambientais e a localização celular da enzima pode ser superficial ou citoplasmática e apresenta aparente impacto sobre o seu papel fisiológico. As catalases normalmente estão situadas no citoplasma, podendo

ser visualizadas na superfície celular. Na região superficial, local comum para a superóxido dismutase, ambas as enzimas inibem o acesso de espécies reativas de oxigênio a componentes sensíveis da membrana celular e citoplasma, podendo atuar efetivamente nos processos alternativos de reparo celular (Zhang et al., 1992, Klotz, 1997, Scandalios et al., 1997).

Nesse estudo, para determinar um possível mecanismo de adaptação ao estresse induzido pelo dibenzotiofeno em *C. elegans* (UCP 596), foram analisados os efeitos no crescimento, em presença de diferentes concentrações do derivado de petróleo, em função da citoquímica ultraestrutural, numa tentativa de elucidar a distribuição, bem como a localização da enzima catalase na célula.

Análise citoquímica da catalase sobre o isolado de *C. elegans* na presença de DBT, permitiu observar a presença de produtos de reação da catalase, sob a forma de grânulos eletrondensos, distribuídos de forma irregular na superfície das hifas, na parede celular, no citoplasma e na região próximo a membrana citoplasmática e discreta marcação em mitocôndrias.

As células sintetizam a catalase, tipicamente, como resposta ao estresse oxidativo. Além disso, maior síntese é também observada em condições de bruscas variações de pH, variações de toxicidade do meio e “starvation” (Zhang et al., 1992).

5. Conclusões

Neste trabalho, a análise ultraestrutural do isolado de *Cunninghamella elegans* crescido em presença do dibenzotiofeno em três concentrações foi realizada, utilizando-se os métodos de rotina e a citoquímica enzimática para catalase utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados obtidos com a técnica de rotina exibem alterações na estrutura fina das hifas, como: presença de vacúolos, eletrondensidade citoplasmática e de parede celular, número de corpos eletrondensos e mitocôndrias. A citoquímica para catalase revela variações na intensidade e

distribuição dos produtos de reação na parede celular, membrana citoplasmática, no citoplasma e mitocôndrias. Tais modificações estão relacionadas à concentração do DBT.

Agradecimentos

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

Referências

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., (1994). *Molecular Biology of the Cell.*, p. 1294. New York, Garland publishers.
2. Ambrósio, S. T. e Campos Takaki, G. M. (2004). Decolorização of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* (UCP-542) under co-metabolic conditions. *Bioresource Technol.* 91, 69 – 75.
3. Bravo, J., Fita, I., Gouet, P., Jouve, H. M., Melick-Adamyan, W., and Murshudov, G. N., (1997). Structure of catalases. *In* J. G. Scandalios (ed.), *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
4. Carlile, M. J.; Watkinson, S. C.; Gooday, G. W. (2004). *The fungi.* (2nd ed.) Elsevier Academic Press, p. 588. London, England.
5. Cerniglia, C. E. e Gibson, D. T. (1977). Metabolism of naphthalene of *Cunninghamella elegans*. *App. Environ. Microbiol.* 34, 363 – 370.
6. Cerniglia, C. E. and Gibson, D. T. (1979). Oxidation of benzo(a)pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *J. Biol. Chem.* 254, 12174 - 12180.
7. Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351 - 368.
8. Crawford, D. e Gupta, R. K. (1990). Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr. Microbiol.* 21, 229 - 231.
9. Datta, D. and Samanta, T. B. (1988). Effect of inducers on metabolism of benzo(a)pyrene in vivo and in vitro: analysis by high pressure liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 493 - 502.

10. Deisseroth, A., and Dounce, A. L., (1970). Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* 50, 319-375.
11. De Souza, W. Citoquímica. In: De Souza, W. (1989). Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica. (Volume II). Citoquímica Ultraestrutural. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro.
12. De Souza, W. (2000). Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, pp. 21 – 47. Rio de Janeiro.
13. Edelman, R. E. e Kloprens, K. L. (1995a). Zygosporogenesis in *Zygorhynchus heterogamus*, with a Proposal for Standardization of Structural Nomenclature. *Mycologia*, 87, 304 - 318.
14. Edelman, R. E. e Kloprens, K. L. (1995b). Low Temperature Scanning Electron Microscopy of the Ultrastructural Development of Zygospores and Sporangiospores in *Mycotipha africana*, and the Effects of Cultural Conditions on Sexual versus Asexual Reproduction. *Mycologia*, 90, 212 – 218.
15. 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). *Braz. J. Microbiol.* 35, 243- 247.
16. Garraway, M. O e Evans, R. C. (1984). Fungal Nutrition and Physiology. John Willey e Sons Incorporation publishers. p. 401.
17. Griffin, D. H. John (1994). Willey e Sons Incorporation Publishers. Fungal Physiology. p. 458.
18. Hollenberg, M. J. e Erickson, A. M. (1973). The Scanning Electron Microscope: Potencial Usefulness to Biologists. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 109 – 130.

19. Jones, D., Vaughan, D. e Mchardy, W. J. (1996). A critical Examination of SEM Ultrastructural Features in Two *Penicillium thomii* Isolates From Soil. *Mycol. Research*, 100, 223 – 228.
20. Kapoor, M. and Lin, W. S. (1984). Studies on the induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in *Neurospora crassa*, and its suppression by sodium selenite. *Xenobiotica*, 14, 903 - 915.
21. Klomparens, K. L. (1990). The Development and Application of Ultrastructural Research in Mycology. *Mycopathologia*, 109, 139 – 148.
22. Klotz, M. G., Klassen, G. R. and Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* 14, 951-958.
23. Loewen, P. C. (1997). Bacterial catalases, p. 273-308. *In* J. G. Scandalios (ed.), *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
24. Lourenço, L. B.; Felisbino, S. L. (2001). 15. Peroxissomos. *In*: Carvalho, H. F. E. e Recco-Pimentel, S. M. (orgs). *A Célula 2001*. Ed. Manole, Barueri, Brasil, pp.72-180.
25. Mckeown, T. A., Moss, S. T., Jones B. G. (1996). Ultrastructure of Ascospores of *Tunicaspora australiensis*. *Mycol. Research*, 100, 1247 - 1255.
26. Mims, C. W. (1991). Using Electron Microscopy to Study Plant Pathogenic Fungi. *Mycologia* 83, 1 - 19.
27. Robinson, J. M. e Karnovski, M. J. (1983). Ultrastructural Localization of Several Phosphatases with Cerium. *J. Histochem. Cytochem.*, 31 (10), 1197 – 1208.
28. Saraswathy, A. and Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiol. Lett.*, 210, 227 - 232.

29. Saikawa, M. e Katsurashima, E. (1993). Light and Electron Microscopy of a New Species of *Eurynancale* Producing Phallus-Shaped Conidia. *Mycologia*, 85, 24 – 29.
30. Scandalios, J. G., Guan, L. and Polidoros, A. N. (1997). Catalase in plants: gene structure, properties, regulation, and expression, p. 343-406. /n J. G. Scandalios (ed.), *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
31. 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.
32. Smith, J. E., Deans, S. G., Anderson, J. G., Davis, B. (1977). The Nature of Fungal Sporulation. In: *Biotechnology and Fungal Differentiation*. FEMS SYMPOSIUM 40, 17 - 41.
33. Souza, P. M., Marinho, P. H., Lima, M. A. B., Nascimento, A. E., Campos-Takaki, G. M. (2005). Copper Influence on Polyphosphate Metabolism of *Cunninghamella elegans*. *Braz. J. Microbiol.* 36, 315-320.
34. Takeo, K.; Mine, H.; Sano, A ; Nishimura, K.; Miyaji, M. (1989). Comparison of Yeast Plasma Membrana Ultrastructure of Various Fungal Taxa. *Proceedings of the Fourth International Symposium of the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses*, pp. 81 – 84. Chiba University.
35. Tanaka, A.; Ueda, M. (1993). Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycol. Research*, 97 (9), pp. 1025-1044.
36. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. and Cole, S., 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358, 591-593.

37. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 798 - 803.

ANEXOS

BIORESOURCE TECHNOLOGY

Submission of papers:

For North and South America: By Mail: Manuscripts (3 copies plus a soft copy on CD) accompanied by a covering letter should be sent to the relevant submission address.

Submission address:

Papers from North and South America only: Dr S.C.Ricke, Food Science Dept., University of Arkansas, 2650 North Young Avenue, Fayetteville, AR 72704-5690, USA;

Papers from Asia-Pacific region and Europe only: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/> The Asia-Pacific region editor is Prof. Ashok Pandey.

It is with deepest sympathy that we notify Authors of the untimely passing away on August 15th of Dr. Vincent Dodd, European Editor. The Publisher and the Editors will take every step to assure the continuity of processing of papers. The Journal hopes to appoint a replacement Editor soon. Authors are advised that delays with European manuscripts may be possible. In the interim we appreciate your understanding.

Submission language: English (Link to the Oxford English Dictionary <http://dictionary.oed.com/entrance.dtl>)

English language help service: Upon request Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Original material: Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Editor's requirements: No special requirements for this journal.

Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing.

Manuscript Preparation:

General:

Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use. An electronic copy of the manuscript on disk should accompany the final accepted version. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to <http://www.elsevier.com/locate/latex>.)

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. For submission in hardcopy, do not import figures into the text - see Illustrations. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 or 10 pt font size and standard fonts.

Corresponding author:

Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Abstract:

Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

Keywords:

Immediately after the abstract, provide a maximum of ten keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

Symbols:

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Units:

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used.

Maths:

Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

References:

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Colour Costs and Queries:

For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour page. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at authorsupport@elsevier.ie, and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>.

FREE ONLINE COLOUR

If, together with your accepted article, you submit usable colour and black/white figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. 'Usable' means the formats comply with our instructions. See the information about Illustrations at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. For colour illustrations in the print journal see Colour Costs above.

Tables:

Tables should be numbered consecutively and given suitable captions and each table should begin on a new page. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (for example, in graphs). Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters.

Electronic Annexes

We strongly encourage you to submit electronic annexes, such as short videos, computer-enhanced images, audio clips and large databases. Please refer to the Artwork Instructions (Multimedia files) at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork> for details on file types to be used. If you are submitting on hardcopy, please supply 3 disks/CD ROMs containing the electronic annex to the editor for review. In the text of your article you may wish to refer to the annex. This is not mandatory, however, if you do wish to refer to the annex in the text then please do so using this example: "?see Electronic Annex 1 in the online version of this article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

Notification:

Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production.

Copyright:

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

PDF Proofs:

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting. For more information on proofreading please go to our proofreading page <http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print.

Author Benefits:

No page charges: Publication in this journal is free of charge.

Free offprints: Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Corresponding authors will be given the choice to buy extra offprints before printing of the article. Authors who pay for colour illustrations will receive an extra fifty offprints free of charge.

Author discount: Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books.

Online Paper Tracking:

Authors can track the status of their accepted paper online at <http://authors.elsevier.com> using the reference supplied by the Publisher.

MICROSCOPY AND MICROANALYSIS

Microscopy and Microanalysis is published bimonthly and contains papers that report original research from the entire interdisciplinary range of microscopy and microanalysis: new microscopy methods and instrumentation and their applications to biological or materials microstructures for determination of structure or chemistry. Four categories of communications are published in the Journal.

Regular articles contain reports of new instrumentation and new theoretical methods and their applications to microstructural analysis in biology and materials science. Communications are short~2000–2500 words! technical or scientific reports of developments in these fields.

Reviews have broader technical content than regular articles. Authors contemplating review articles are encouraged to discuss their plans with the appropriate editor. Articles are accepted for publication with the understanding that they, or their substantive contents, have not been and will not be submitted to any other publication.

Readers may send Letters to the Editor for publication in the Journal. These must address a specific technical point or points in a published article and must be clearly written and concise. The corresponding author of the paper commented upon will be invited to reply. The author of the Letter to the Editor will not be sent the reply prior to publication. Both the Letter to the Editor and the Reply will be published together. No subsequent letters or replies by the same persons concerning that particular paper will be considered for publication. The appropriate Editor will make any necessary decisions concerning suitability for publication of particular Letters to the Editor or Replies.

Manuscript Submission and Review

All manuscript submissions to *Microscopy and Microanalysis* must be made electronically via Manuscript Central, at the following website address: <http://mc.manuscriptcentral.com/mam>

Complete instructions are provided on this website. Please follow the instructions on the website to avoid delays. The instructions will prompt the author to provide all necessary information, including the corresponding author's contact information, which includes complete mailing address, phone and fax numbers, and an e-mail address. The website also requests suggested reviewers. The website will automatically acknowledge receipt of the manuscript and provide a manuscript reference number. The Editor-in-Chief will assign the manuscript to an Editor who will choose at least two other reviewers. Every effort will be made to provide the author with a rapid review. If the Editor requests that revisions be made to the manuscript before publication, a maximum of 3 months will be allowed for preparation of the revision.

Manuscript Preparation

General information. Manuscripts must be submitted in English. Authors should follow generally accepted rules of grammar and punctuation. Because articles on microscopy attract broad ranges of readers with diverse backgrounds, jargon should not be used; acronyms and abbreviations must be clearly defined the first time they are used and then used consistently thereafter throughout the manuscript.

Format. All manuscripts must be typed double-spaced, including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, in 12 point type. Pages should have margins of about 1 inch ~about 2.5 cm!. Number all pages at the bottom.

All manuscript title pages must contain:

- _ A complete title.
- _ A brief title to be used as a running head.
- _ Authors' names listed by full given and last names.
- _ Primary institutions where the research was performed.
- _ Other institutions involved for each author.
- _ Permanent or new addresses of all authors. Note: Institutional addresses must include the full institutional and department/center name, city, state, postal code, and country.
- _ A complete corresponding ~mailing! address for the author to whom all correspondence should be sent.
- _ Corresponding author's telephone number and fax number, and e-mail address.

All manuscripts must include:

- _ An abstract not to exceed 200 words and 6 to 10 key words for indexing.
- _ The following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Summary or Conclusions, Acknowledgments, References, tables, figure legends, figures. Sections may be subdivided to increase clarity.

Chemical names and mathematical expressions. Chemical names and methods should be spelled out the first time they are used, followed by the abbreviation in parentheses. After first mention the abbreviation may be used alone. SI units should be used. Mathematical expressions need to be carefully presented, with all symbols defined. Use a type font that clearly differentiates between zero and capital letter O. Equations containing algebraic fractions should use numerator over denominator, separated by a horizontal line, and not typed on a single line separated by a slash. Indicate vector symbols; they will be printed in bold.

References. References must be inserted in the text at the place they are used, by the author's surname and year of publication. All references included in the reference list must be cited in the text. References to personal communications, unpublished data, and manuscripts either in preparation or submitted for publication are unacceptable. If essential, such material may be incorporated in the appropriate place in the text. For references with more than two authors use the first author's surname followed by "et al." and if there is more than one reference in the same year by a single author's, use *a*, *b*. For example: (Roberts, 1981); (Roberts e Johnson, 1983); (Jones et al., 1986); (Johnson, 1998*a*, 1998*b*). All authors must be included in the reference list; "et al." is unacceptable here. The alphabetical list of references begins a new page, and must be typed double-spaced. List works by different authors who are cited within the same parentheses in chronological order, beginning with the earlier work according to the *CBEManual for Authors, Editors, and Publishers*. Abbreviate journal names according to the Chemical Abstracts Service Source Index ~CASSI!. Only published articles and articles in press should appear in this list. Responsibility for the accuracy of references cited lies with the authors. Brief examples:

Journal Articles

Hogan, J. e Patton, C. ~1976!. Variation in intramembrane components of *Trypanosoma brucei* from intact and X-radiated rats: A freeze-cleave study. *J Protozool* 23, 205–215.

Entire Book

Rappaport, R. ~1996!. *Cytokinesis in Animal Cells*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Chapter in an Edited Book

Gardner, R.L. e Papaioannou, V.E. ~1975!. Differentiation in trophoblast and inner cell mass. In *The Early Development of Mammals*, Balls, M. e Wild, A.E. (Eds.), pp. 107–132. Cambridge, New York: Cambridge University Press.

Proceedings Paper

Wood, J.E., Williams, D.B. e Goldstein, J.I. ~1981!. Quantitative X-ray Microanalysis in the Analytical Electron Microscope. In *Quantitative Microanalysis with High Spatial Resolution*, Jacobs, M.H., Lorimer, G.W. e Doig, P. ~Eds.!, pp. 24–33. London: The Metals Society.

Tables. Tables must be uploaded individually at the website. Number tables consecutively using Arabic numbers and include concise titles and column headings. Type footnotes under the tables. All tables must be cited consecutively in the text.

Guidelines for Figure Preparation

Figures must be uploaded individually at the website. Figures should be professionally drawn and prepared according to the guidelines below. Symbols, letters, numbers, and scale bars should be of sufficient size to be clearly recognizable when the figure is reduced to publication size, usually one column width ~84 mm!. Figure captions must be doublespaced and appear on a separate page in the text document. All figures must be cited in the text. Photographs in which human subjects are identifiable must be accompanied by written permission for publication.

Note the following specifications

_ Black and white figures: Raster ~scanned! images should be submitted in grayscale mode for continuous-tone images and as bitmaps for line art.

_ Color figures: Color images should be submitted in CMYK color mode. Do not submit files in RGB color. Files should be free of color functions, including PostScript color management, transfer curves, halftone screen assignments, and black generation functions.

_ Digital resolution: Raster ~scanned! image files should be:

_ at least 300 dpi for continuous tone images (grayscale or color);

_ at least 900 dpi for monochrome (1-bit) line art.

_ Image Size/Crop: Digital art files should be cropped to remove nonprinting borders. Lettering and axis labels for graphs should remain legible when reduced to an image width of 84 mm. Letters within a word should not touch at this reduction. The submitted image orientation should be the same as intended for print.

_ Lines: Lines or rules should not be defined as hairline width. The recommended minimum line width is 1/4 point when the file is

supplied at the same size as the final print; thicker lines must be used if the figure is to be reduced.

_ File Format: Rastered image files (continuous tone or line art) Should be submitted only in “.tif”, “.eps”, or “.psd” format. For vector “.eps” or “.ai” files, fonts should be embedded or converted to outlines. Images should be flattened prior to submission; this means that files should not contain layers and/or transparent objects.

_ Submission: Each figure must be uploaded separately from the text document of the manuscript.

Printed Color Figures. If you will not be paying to have your figures printed in color, your figures can still be in color in the electronic version of the paper. However, for the printed figure you must supply a grayscale monochrome version that can be completely understood without the need of color. Contrast adjustments may be necessary before submitting the grayscale image or figure.

Permissions. All previously published material included in your manuscript must be accompanied by permission forms or letters documenting that permission has been obtained to reprint the material in your article in this journal.

Guidelines for Reviewers

Microscopy and Microanalysis publishes original research papers and reviews dealing with a broad range of topics in microscopy and microanalysis. These include articles describing new techniques or instrumentation and their applications, as well as papers in which established methods of microscopy or microanalysis are applied to important problems in the fields of biology or materials science. The terms microscopy and microanalysis are used here in their broad sense and include all current and developing approaches to the imaging and analysis of microstructure. In reviewing this manuscript please answer the following questions:

- _ Is this manuscript suitable for *Microscopy and Microanalysis*?
- _ Is the work presented here original ~not previously published except in MeM 2-page format!?
- _ Does the abstract provide the main conclusions of the paper?
- _ Are acronyms and abbreviations defined when first used?
- _ Are SI units used throughout ~other units may be given in parentheses!?
- _ Are the figures of high quality and easy to understand when read with the captions provided?
- _ Are references in the format described in the "Instructions for Contributors"?
- _ Is the English clear and easy to understand?

Please provide specific guidance to the author concerning any of the questions above which you must answer in the negative. Your comments are the most important part of this review.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

Long-Form Papers

Long-form papers should include the elements described in this section.

Title, running title, and byline.

Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a main title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page, include the title, running title (not to exceed 54 characters and spaces), name of each author, address(es) of the institution(s) at which the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place an asterisk after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "Correspondent footnote" below).

Study group in byline.

A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given in a footnote keyed to the study group name in the byline or as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote.

The complete mailing address, a single telephone number, a single fax number, and a single e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication, and the e-mail address will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article.

Abstract.

Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the

References section but omit the article title. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction.

The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Use only those references required to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Materials and Methods.

The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state "cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)" rather than to state "cells were broken as previously described (9)." This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, plasmids, etc. Parameters such as temperature, pH, and salinity (or conductivity) must be reported for environmental samples that are extracted for molecular analyses.

A method, strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results.

In the Results section, include only the results of the experiments; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine apparent K_m values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly, graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be shown except in unusual circumstances. Limit photographs (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion.

The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results

section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments.

The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: "This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute."

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes.

Appendixes, which contain additional material to aid the reader, are permitted. Titles, authors, and References sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either long-form or short-form style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References.

(i) References listed in the References section.

The References section must include all journal articles (both print and online), books and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, published conference proceedings, meeting abstracts from published abstract books or journal supplements, letters (to the editor), and company publications, as well as in-press journal articles, book chapters, and books (publication title must be given). Arrange the citations in alphabetical order (letter by letter, ignoring spaces and punctuation) by first author and number consecutively. Provide the names of all the authors for each reference. All listed references must be cited parenthetically by number in the text. Since title and byline information that is downloaded from PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the *List of Journals Indexed for Medline* (National Library of Medicine, National Institutes of Health, 2007; available at <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>), the primary source for ASM style.

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. Arendsen, A. F., M. Q. Solimar, and S. W. Ragsdale. 1999. Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 181:1489-1495.
2. Cox, C. S., B. R. Brown, and J. C. Smith. *J. Gen. Genet.*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
3. da Costa, M. S., M. F. Nobre, and F. A. Rainey. 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295,^{AL} emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p. 404-414. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 1. Springer, New York, NY.

4. Elder, B. L., and S. E. Sharp. 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, DC.
5. Falagas, M. E., and S. K. Kasiakou. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2274-2275. (Letter.) { "Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry. }
6. Fitzgerald, G., and D. Shaw. In A. E. Waters (ed.), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co., Boston, MA.* { Chapter title is optional. }
7. Forman, M. S., and A. Valsamakis. 2003. Specimen collection, transport, and processing: virology, p. 1227-1241. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, J. H. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
8. Garcia, C. O., S. Paira, R. Burgos, J. Molina, J. F. Molina, and C. Calvo. 1996. Detection of salmonella DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients. *Arthritis Rheum.* 39(Suppl.):S185. { Meeting abstract published in journal supplement. }
9. Green, P. N., D. Hood, and C. S. Dow. 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p. 251-254. In R. L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbial growth on C₁ compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. Odell, J. C. April 1970. Process for batch culturing. U.S. patent 484,363,770. { Include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory. }
11. O'Malley, D. R. 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles. { Title is optional. }
12. Rotimi, V. O., N. O. Salako, E. M. Mohaddas, and L. P. Philip. 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. *Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr. D-1658. { Abstract title is optional. }
13. Smith, D., C. Johnson, M. Maier, and J. J. Maurer. 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr. P-038, p. 445. Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. { Abstract title is optional. }
14. Stratagene. 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. { Use the company name as the author if none is provided for a company publication. }

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., AEM00577-08) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

Online references must provide the same information that print references do, but some variation is allowed. For online journal articles, posting or revision dates may replace the year of publication, and a DOI or URL may be provided in addition to or in lieu of volume and page numbers. Some examples follow.

1. Charlier, D., and N. Glansdorff. September 2004, posting date. Chapter 3.6.1.10, Biosynthesis of arginine and polyamines. *In* R. Curtiss III et al. (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC. <http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>. {Note that each chapter has its own posting date.}
2. Dionne, M. S., and D. S. Schneider. 2002. Screening the fruitfly immune system. *Genome Biol.* 3:REVIEWS1010. <http://genomebiology.com/2002/3/4/reviews/1010>.
3. Smith, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman. 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2250-2255. doi:10.1073/pnas.041593698.
4. Winnick, S., D. O. Lucas, A. L. Hartman, and D. Toll. 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* 115:e718-e724.

NOTE: A posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed.

(ii) References cited in the text.

References to unpublished data, manuscripts submitted for publication, unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings), personal communications, patent applications and patents pending, computer software, databases, and websites (home pages) should be made parenthetically in the text as follows.

... similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

... system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

... as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {For nonpublished abstracts, posters, etc.}

... this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.}

... available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

... using ABC software (version 2.2; Department of Microbiology, State University [<http://www.stu.micro>]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may NOT be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

(iii) References related to supplemental material.

References that are related only to supplemental material hosted by ASM or posted on a personal/institutional website should not be listed in the References section of an article; include them with the supplemental material itself.

(iv) Referencing publish-ahead-of-print manuscripts.

Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example.

Wang, G. G., M. P. Pasillas, and M. P. Kamps. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.00586-06.

If an author of an article cites an ASM Accepts manuscript in his paper but wishes at the proof stage to change the reference entry to that for the published article, the following style should be used:

Wang, G. G., M. P. Pasillas, and M. P. Kamps. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.00586-06. (Subsequently published, *Mol. Cell. Biol.* 26:3902-3916, 2006.)

Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

Zhou, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman. 13 February 2001, posting date. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* doi:10.1073/pnas.041593698.

Souza, Patrícia Mendes de
Metabolismo do Dibenzotiofeno por *Cunninghamella elegans* associados aos estudos morfológicos e ultraestruturais / Patrícia Mendes de Souza. – Recife: O Autor, 2008.

134 folhas. : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2008.

Inclui bibliografia e anexos

1. Fungos – Zigomicetos – Aplicações industriais. 2. *Cunninghamella elegans* – Dibenzotiofeno (DBT) – Morfologia. I. Título.

582.28
579.5

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

UFPE
BC - 2008 - 029

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)