



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PESQUISA
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Adriana de Freitas Lima

**COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL DE *Trichoderma harzianum*
EM RESPOSTA A PRESENÇA DE CÁDMIO**

Recife

2008

Adriana de Freitas Lima

**COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E
ULTRAESTRUTURAL DE *Trichoderma harzianum*
EM RESPOSTA A PRESENÇA DE CÁDMIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento em Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente

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

Recife

2008

L372c

Lima, Adriana de Freitas

Comportamento bioquímico e ultraestrutural de trichoderma harzianum em resposta a presença de cádmio / Adriana de Freitas L Lima ; orientador Aline Elesbão do Nascimento.

106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos ambientais, 2008.

1. Trichoderma harzianum. 2. Cádmio. 3. Fosfatases. I. Título

CDU 577.1

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL DE *Trichoderma harzianum* EM RESPOSTA A PRESENÇA DE CÁDMIO

Adriana de Freitas Lima

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Aline Elesbão do Nascimento
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^o. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Faculdades Integradas de Patos – FIP - Paraíba

Data de aprovação - Recife, 28 de fevereiro de 2008

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

Dedico ao meu filho João Gabriel
por toda inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Aline Elesbão do Nascimento pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, pelo apoio, atenção e dedicação ao programa, e por ter me ajudado em todos os momentos em que precisei;

A todos os meus colegas de trabalho Livia Lima, Gabrielle Moura, Petrusk Homero e Patrícia Souza pela amizade e colaboração, no transcorrer deste trabalho, e por todos os momentos em que convivemos, em especial Jônatas Lima, Bernadete Negromonte e Mércia Lino;

Aos meus colegas do Mestrado Aziel Arruda e Andréa Costa pelos momentos gratificantes;

Aos professores do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

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

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

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iv
CAPÍTULO 1	
RESUMO	v
ABSTRACT	
1.1 Introdução	6
1.2 Objetivos	9
1.2.1 Objetivo Geral	9
1.2.2 Objetivos Específicos	9
1.3 Revisão da Literatura	10
1.4 Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO 2	
Aspectos Bioquímicos e Estruturais da Tolerância e Toxicidade do Cádmio em <i>Trichoderma harzianum</i>	39
2.1. Abstract	39
2.2 Resumo	40
2.3 Introdução	41
2.4 Material e Métodos	43
2.5 Resultados	45
2.6 Discussão	54
2.7 Referências Bibliográficas	59
CAPITULO 3	67
Comportamento do Polifosfato em <i>Trichoderma harzianum</i> Cultivado na presença de Cádmio	
3.1 Resumo	67
3.2 Abstract	68
3.3 Introdução	69
3.4 Métodos	70
3.5 Resultados e Discussão	73
3.6 Referências Bibliográficas	87
CAPITULO 4	97
Anexo 1	97
Anexo 2	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.6.1	(Figura1) Esquema básico envolvido na remoção e recuperação de metais de solução aquosa por microrganismos (GADD;1988).	23
Figura 2.5.1	(Figura 1A) Curva do comportamento da atividade da fosfatase alcalina no micélio de <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado na presença e ausência de cádmio.	46
Figura 2.5.1	(Figura 1B) Curva do comportamento da atividade da fosfatase ácida no micélio de <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado na presença e ausência de cádmio.	46
Figura 2.5.2	(Figura 2) Microscopia Óptica de amostras de <i>Trichoderma harzianum</i> . A cultura controle; B. cultura tratada com 1mM de cádmio; C .cultura tratada com 2mM de cádmio e C. cultura tratada com 3mM de cádmio.	49
Figura 2.5.3	(Figura 3) Eletronmicrografias de <i>Trichoderma harzianum</i> . A. Amostra Controle 3 dias; B.Amostra Controle 15 dias; C. Amostra Cultivada em 1mM de cádmio 3 dias; D. Amostra Cultivada em 1mM de cádmio 15 dias; E. Amostra Cultivada em 2 mM de cádmio 3dias; F. Amostra Cultivada em 2 mM de cádmio 15 dias; G. Amostra Cultivada em 3 mM de cádmio 3dias; H. Amostra Cultivada em 3 mM de cádmio 15dias. 1700X.	51
Figura 2.5.4	(Figura 4) Perfil de Proteínas Totais de <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado na ausência e na presença de cádmio	53
Figura 3.3.1	(Figura 1) Figura 1 A, 1 B, 1 C e 1 D apresentam os resultados obtidos para o cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> sp, cultivado em meios YMA, EM, SAB e BDA, na ausência e presença de cádmio, nas concentrações de 1mM, 2 mM e 3 mM	75
Figura 3.3.2	(Figura 2) Perfil de consumo de glicose e curvas de crescimento do isolado de <i>Trichoderma harzianum</i> em meio Sabouraud Líquido na presença e ausência de cádmio. A. consumo de glicose; B. curva de crescimento.	76

Figura 3.3.3	(Figura 3) Perfil do polifosfato celular de <i>Trichoderma harzianum</i> , cultivado na ausência e na presença de cádmio.	80
Figura 3.3.4	(Figura 4) Remoção de íons cádmio do meio de cultura por <i>Trichoderma harzianum</i> . 201,33mg/L- 1mM; 402,66 mg/L - 2 Mm e 603,99 mg/L - 3 mM.	83
Figura 3.3.5	(Figura 5) Eficiência de remoção de íons cádmio pelo micélio de <i>Trichoderma harzianum</i> .	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.1	Tabela 1: Fontes Causadoras de Poluição Por Cádmiu (MESQUITA, 1993).	19
Tabela 1.1.2	Tabela 2: Exemplos de acúmulo de metais por microrganismo (MESQUITA, 1993)	22

RESUMO

Considerando o potencial biotecnológico do fungo *Trichoderma harzianum* no processo de metabolização de compostos xenobióticos e sua resistência a metais pesados, o presente trabalho teve como finalidade estabelecer conhecimentos bioquímicos e ultraestruturais associados ao processo de remoção de cádmio. O microrganismo foi cultivado em meio contendo diferentes concentrações de cádmio: 1mM, 2mM e 3mM. O perfil de crescimento foi estabelecido em função da biomassa produzida, do consumo de glicose e fosfato, conteúdo intracelular de polifosfato, atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina, perfil de proteínas totais e remoção do metal. Os resultados obtidos sugerem efeitos do metal sobre o crescimento do organismo em diferentes meios de cultura. O crescimento em meio padrão revela a tolerância do organismo frente a altas concentrações de cádmio, e que tal cultivo induz variações no consumo de glicose e atividade das fosfatases. A utilização da microscopia óptica revelou variação na morfologia do organismo como resposta a variação do meio de cultivo e da presença e ausência do metal. Modificações relativas a processo de ramificação, textura e espessura das hifas foram visualizadas. Os aspectos ultraestruturais através de varredura demonstraram que *T. harzianum* cultivado na presença de cádmio apresentou variações associadas a eletrondensidade, densidade micelial, maior ramificação e menor número de clamidósporos. A análise do perfil de proteínas totais revelou que o cultivo em cádmio induziu a diminuição do conteúdo de proteínas dependendo da concentração. O isolado foi capaz de acumular polifosfato, e a presença do metal induziu a degradação do polímero em função da concentração. A remoção de cádmio do meio foi avaliada, revelando variação em função da concentração. Os resultados demonstram o efeito do cádmio sobre *T. harzianum*, pela primeira vez, e demonstram o potencial do microrganismo em acumular polifosfato e sua possível aplicação na remediação de metais pesados.

Palavras-Chave: *Trichoderma harzianum*, Cádmio, Fosfatases, Polifosfato, Ultraestrutura.

ABSTRACT

Considering the biotechnological potential of *Trichoderma harzianum* in the xenobiotic metabolization and its resistance to heavy metals, the aim of this work was to evaluate the ultrastructural and biochemical behavior related to cadmium tolerance and removal. The microorganism was grown in different media, containing 1mM, 2mM and 3mM of cadmium. Aspects of the growth profile was obtained by biomass production, glucose consumption, acid and alkaline phosphatase activities, morphology by optical microscopy, ultrastructure by scanning electron microscopy, total protein profile, polyphosphate accumulation and metal removal were evaluated. The results obtained revealed the inhibitory effects of the heavy metal on the microbial growth and the aspects of the tolerance to cadmium. The glucose consumption and the enzymes activities were also affected by cadmium and its different concentrations. The morphological analysis revealed variations related to hyphae thickness, branching pattern, texture and homogeneity, electron density, and presence of granular structures. The ultrastructural aspects revealed alterations related to cell electron density, mycelia density, branching pattern and reduced chlamidospores number. The grown in presence of the metal induced a reduction in the total protein content related to cadmium concentration. The isolate was able to accumulate polyphosphate, and its grown in cadmium induced the polymer degradation. The cadmium removal was observed and revealed variations related to metal concentrations. The results for the first time revealed the effects of cadmium on *T. harzianum* polyphosphate accumulation and its potential application in the metal remediation.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, Cadmium, Phosphatases, Polyphosphate, Total Proteins, Ultrastructure.

1.1. Introdução

Os fungos são organismos extremamente versáteis em suas respostas em função de variações ambientais. Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação, e microelementos influenciam o metabolismo e conseqüentemente, o crescimento celular, a diferenciação, formação de estruturas reprodutivas e diferenciação sexual (GARRAWAY e EVANS, 1984; GRIFFIN, 1994; AOKI e NIRENBERG, 1999; KANA-UCHI e KUKATSUI, 1999; KIHARA et al., 1999; KITAMOTO et al., 1999; THAM et al., 1999).

A indústria é responsável pela produção de diferentes substâncias poluentes encontradas na natureza, produzindo um imenso número de compostos tóxicos. Define-se poluição como sendo toda alteração das propriedades naturais do ambiente que seja prejudicial à saúde, à segurança ou ao bem-estar da população sujeita a seus efeitos, causada por agente de qualquer espécie. Dentre os principais poluentes, os metais pesados e seus derivados exercem papel preponderante, os quais são diretamente prejudiciais à saúde humana e cujas substâncias orgânicas comprometem a manutenção dos processos vitais. Diversos ramos industriais são responsáveis pela contaminação ambiental por metais pesados, entre estes: as indústrias de papel, petroquímica, de cloro, de fertilizantes, usinas siderúrgicas, indústrias de metais não-ferrosos, automóveis e aviões, de vidro, de cimento, cerâmica, indústria têxtil, indústria de couros e usinas termoelétricas. Na tentativa de reduzir os severos problemas causados por elevados níveis de concentração de metais no ambiente, vários estudos têm sido desenvolvidos para estabelecer parâmetros para a diminuição da concentração destes elementos em efluentes industriais (CONAMA, 1986; FELLEBERG, 1990).

Apesar da contaminação por metais pesados ser um fator desencadeante de processos tóxicos para peixes, crustáceos, plantas aquáticas, mamíferos e microrganismos,

tais elementos ocorrem naturalmente e muitos deles são componentes essenciais do ecossistema global (PINTO et al. 2002). Estes metais podem ser facilmente transportados quando em solução e, muitas vezes, podem alcançar altas concentrações em áreas fechadas por sua própria disposição ou por amplificação biológica. Em geral, o tratamento de ambientes contaminados por metais envolve processos físico-químicos de precipitação, floculação, eletrólise, cristalização ou adsorção; entretanto, estes processos podem ser onerosos e/ou contribuir para formação de novos contaminantes ambientais; assim, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias mais econômicas e práticas para a remoção dos metais (UNZ et al., 1996; PINTO et al. 2002).

Os metais são contaminantes de extrema letalidade de tal forma que o estudo da toxicidade de metais pesados em plantas e microrganismos vem atraindo a atenção de muitos cientistas do ambiente. De todos os metais pesados poluentes, o cádmio é um dos mais tóxicos para os seres humanos, animais e plantas. Também, dentre esses elementos, é o que apresenta as mais altas taxas de emissão para o ambiente nas últimas décadas. O cádmio é um poluente bastante difundido, bastante tóxico e sem função biológica conhecida (PINTO et al., 2002).

Os microrganismos desenvolveram, ao longo da evolução, um grande número de mecanismos de tolerância que permitem seu pleno desenvolvimento, mesmo na presença de grandes quantidades de metais pesados: exclusão; excreção; seqüestro e transformação. Tais mecanismos são primariamente ativos quando o sistema é exposto à presença do metal. Por outro lado, os microrganismos exibem mecanismos de tolerância ditos passivos, uma vez que não são induzidos na presença do metal, mas sem dúvida aumentam a resistência celular. Tem sido sugerido que um possível mecanismo seja a quelação intracelular através de um polímero aniônico de cadeia longa, o polifosfato (KORNBERG et al 1999).

Dessa forma, polifosfato e as enzimas associadas ao seu metabolismo são moléculas de essencial importância em inúmeros eventos e fenômenos relacionados ao crescimento e

manutenção celular sob inúmeras condições ambientais. Sendo assim, estudos direcionados para a identificação, localização e mapeamentos dessas moléculas permitirão um maior entendimento sobre inúmeros eventos biológicos, não apenas ao nível ultraestrutural, bem como ao nível bioquímico e fisiológico (DE SOUZA, 2000).

As fosfatases ácida e alcalina compõem o grupo de enzimas chamadas fosfomonoesterases, não específicas, que hidrolisam uma variedade de ésteres orgânicos, com a liberação de íons de fosfato, estando desta forma envolvidas no metabolismo do fosfato. Estas duas fosfatases diferem tanto no pH ótimo de atividade, como na localização celular e suas atividades podem ser intensificadas pela ausência/presença de fosfato no meio de cultura (JOH et al., 1996).

Polifosfatos, por sua vez, atuam como fonte de energia, elementos de reserva de fósforo inorgânico, substituto de ATP, tampão para álcalis, quelante de metais e regulador de resposta ao “stress”. É adicionalmente utilizado na indústria como antibacteriano, antimicótico, aditivo, emulsificante e antioxidante, e no descarte ecológico de poluentes fosfatados (HAROLD, 1966; GREENFIELD et al., 1987; KORNBERG, 1995). Paralelamente, nos últimos anos, vários laboratórios têm investigado a relação entre o nível de polifosfato e a resistência a metais pesados, como forma de gerar conhecimento para melhorar e propor alternativas para a remoção de metais, utilizando microrganismos (KULAEV, 2000; KEASLING et al., 2000; MINO et al., 1998; VAN LOOSDRECHT et al., 1997).

A biotecnologia aplicada ao meio ambiente, embora ainda considerada uma área de pesquisa emergente, mostra-se potencialmente capaz de responder com soluções efetivas para uma grande variedade de problemas de poluição ambiental. Neste sentido, não apenas proporciona métodos para o tratamento de rejeitos industriais, mas também pode contribuir para a biorremediação de ambientes já contaminados.

Outrossim, considerando a habilidade do *Trichoderma harzianum* de metabolizar compostos xenobióticos e remover metais pesados, bem como a relação do polifosfato com

tolerância e resistência aos metais pesados, o presente trabalho visa ampliar os conhecimentos bioquímicos e ultraestruturais do processo de remoção de cádmio pelo microrganismo.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento bioquímico e ultraestrutural de *Trichoderma harzianum*, tendo em vista a sua importância e o seu valor agronômico e biotecnológico.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil de crescimento de *Trichoderma harzianum* em presença e ausência de cádmio;
- Determinar o perfil das fosfatases ácida e alcalina em função do cultivo em presença de cádmio;
- Avaliar o comportamento morfológico e ultraestrutural de *Trichoderma harzianum* durante o processo de remoção de cádmio.
- Determinar o perfil das proteínas totais em função do cultivo em presença de cádmio
- Caracterizar as variações e o comportamento do polifosfato presente em *Trichoderma harzianum* na presença e ausência de cádmio;
- Avaliar e caracterizar a cinética de remoção de cádmio pelo micélio de *Trichoderma harzianum*.

1.3. Revisão da Literatura

1.3.1. Fungos: *Trichoderma harzianum*

Os microrganismos são capazes de habitar qualquer nicho ambiental em função de suas relações dinâmicas com os constituintes do sistema. As diferentes populações de microrganismos sofrem mudanças em função do ambiente. Tais populações podem induzir significativas alterações nos ambientes nos quais se encontram devido as suas respostas metabólicas. Dessa forma, o somatório dos vários processos metabólicos dos microrganismos em qualquer nicho ambiental resulta em transformações dos aspectos físicos, químicos e biológicos dos ecossistemas que constituem o ambiente (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são organismos cosmopolitas capazes de obterem energia de uma grande variedade de substratos. Conseqüentemente, desse fato surgem inúmeras habilidades, que tornam tais organismos alvo de estudos relacionados a modelos de vias biológicas, modelos para análises genéticas, visando exploração nas áreas industrial, médica e biotecnológica (GARRAWAY e EVANS, 1984).

Membros do gênero *Trichoderma* são importantes fungos cosmopolitas, de ampla distribuição, saprófitas de solo, de grande importância como agentes de decomposição, exibem crescimento exuberante e em curtos intervalos de tempo. As colônias são originalmente algodonosas e variam entre branco e verde. Exibem conidióforos ramificados, com fiáides divergentes e em forma de garrafa. Conídios geralmente verdes, lisos ou rugosos, forma globosa a elipsoidal (GRIFFIN, 1994).

As habilidades antifúngicas desses microrganismos são reconhecidas desde 1930, e esforços têm sido empregados no seu uso para controle de doenças em plantas. Alguns isolados colonizam e penetram nos tecidos das raízes e iniciam uma série de alterações morfológicas e bioquímicas nas plantas, conduzindo a uma resistência sistêmica no vegetal. Além de colonizarem raízes, atacam e parasitam outros fungos (micoparasitismo) através de

inúmeros mecanismos, que culminam com a formação de produtos que favorecem o desenvolvimento das plantas (BOLAR, 2000, HARMAN, 2004, LORITO, 1998, OMERO, 1999).

Paralelamente, possuem resistência inata contra a maior parte dos produtos químicos usados na agricultura, incluindo fungicidas, inseticidas e pesticidas, embora ocorra variação no padrão da resistência em função do isolado. Alguns isolados têm sido selecionados e/ou modificados por serem especificamente resistentes (PAPAVISAS, 1985; YEDIDA et al., 1999, 2000, 2001, 2002).

Dessa forma, o amplo uso de isolados do gênero *Trichoderma* baseia-se na sua habilidade de degradar polímeros vegetais, como celulose, e antagonizar outros fungos. Por essa razão, isolados de *Trichoderma harzianum* têm sido comumente usados como agentes para o biocontrole de fungos patogênicos de plantas. Diversos mecanismos têm sido considerados como fatores-chave nas interações antagônicas: lise da parede dos hospedeiros; antibiose; competição por nutrientes; indução de resistência e inativação de enzimas (HARMAN, 2004, SHORESH et al., 2005, VITERBO et al., 2005).

A habilidade antagonística dos isolados com potencial reside nos perfis de enzimas extracelulares, como por exemplo: alfa-glicosidases, celulasas, celobiohidrolase, endocelulase, xilosidase, endoxilanase, proteases semelhantes à tripsina e quimotripsina; 1,4-N-acetil-glicosaminidase e laminarinase. Paralelamente, espécies de fungos do gênero *Trichoderma spp.* são altamente eficientes na produção de muitas enzimas extracelulares. Usadas comercialmente na produção de celulasas, entre outras enzimas que degradam polissacarídeos complexos. Dessa forma, são amplamente empregados na indústria de alimentos e têxtil (OMERO, 1999, OMERO 2001, SHORESH et al., 2006, VITERBO et al., 2001, 2002, 2004, 2006).

As habilidades competitivas das espécies são significativamente influenciadas por inúmeros parâmetros ambientais, como temperatura, disponibilidade de água, presença de pesticidas, metais pesados e a presença de bactérias antagonísticas de solo (YEDIDA et al.,

1999, 2000, 2001, 2002).

Paralelamente, têm a habilidade de incrementar o crescimento, bem como a produtividade vegetal. Porém, em muitos casos, esse efeito parece estar associado à solubilização de nutrientes, de outra forma indisponíveis. Sabe-se que, no solo, macro e micronutrientes sofrem um complexo equilíbrio dinâmico de solubilização e insolubilização que são fortemente influenciados pelo pH e microflora dos solos, o que, em última instância, afeta sua acessibilidade para as raízes. Dessa forma, as interações microbianas com raízes dos vegetais alteram o “status” de nutrição das plantas. Espécies de *Trichoderma* estão entre os organismos biocontroladores, sendo sugerido que os mecanismos para tal fenômeno residem em micoparasitismo, antibiose, competição e indução de respostas de defesa no hospedeiro (YEDIDA et al., 1999, 2000, 2001, 2002).

Adicionalmente, vários genes têm sido clonados de isolados de *Trichoderma spp*, oferecendo potencial como transgenes para produzir sementes que são resistentes a inúmeras patologias (YEDIDA et al., 2002; VITERBO et al., 2001, 2002, 2006).

Por outro lado, a versatilidade desse gênero também tem sido explorada na produção de metabólitos com atividade antiviral e antibacteriana (GOLDMAN e GOLDMAN, 1998).

1.3.2. Polifosfato

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

Ao longo da evolução dos seres vivos as funções mais importantes da molécula para os procariotos correspondem àquelas de reserva de fosfato e fonte de energia, enquanto, nos eucariotos predominam as funções reguladoras (KULAEV e KULAKOVSKAYA,

2000; KULAEV et al., 2000).

O metabolismo do polifosfato é mantido por diferentes grupos de enzimas, responsáveis pelo equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação, de modo que qualquer interferência nesse balanço resulta em um acúmulo ou na degradação total deste polímero pela célula (KEASLING et al., 1993; KURODA e KORNBERG, 1997; SHIBA et al., 2000; TZENG e KORNBERG, 2000; WOOD e CLARCK, 1988; BOLESCH e KEASLING, 2000; KUMBLE e KORNBERG, 1996).

O comportamento dinâmico do polifosfato, seu acúmulo e consumo, é o aspecto mais notável de seu metabolismo em microrganismos. O desequilíbrio entre síntese e degradação resulta em variações entre 100 a 1000 vezes a concentração. Em geral, a quantidade de polifosfato durante a fase exponencial de crescimento é baixa, elevando-se no início da fase estacionária. No entanto, o acúmulo de polifosfato em resposta ao “stress” ambiental imposto por limitações nutricionais, variações de pH, osmolaridade e tensão de oxigênio têm sido descritos em inúmeros microrganismos, principalmente em bactérias e leveduras (HAROLD, 1966; RAO et al., 1996, 1998; BARAK e RIJN, 2000; KURODA e OHTAKE, 2000; MCGRATH e QUINN, 2000).

Ao mesmo tempo, o polifosfato de cadeia longa apresenta atividade bactericida e bacteriostática quando testado contra *Bacillus cereus*. Entretanto, esses efeitos antimicrobianos dependem da concentração do polifosfato e da fase de crescimento da célula, visto células na fase estacionária de crescimento não foram afetadas (RASHID et al., 2000 ; RASHID e KORNBERG, 2000a e 2000b).

Os distintos processos que resultam no acúmulo de polifosfato pelos microrganismos, e que podem ser induzidos por fatores ambientais, têm várias implicações biotecnológicas. Um desses processos envolve o acúmulo de polifosfato por microrganismos submetidos a ciclos anaeróbicos/aeróbicos alternados. Este fenômeno é a base do processo de tratamento de efluentes contaminados com fosfato, designado de “remoção melhorada de fosfato biológico”. Além disso, organismos com habilidade de acumular polifosfato podem

ser utilizados na biorremediação de efluentes contaminados com metais pesados, haja vista que vários estudos terem demonstraram a associação de grânulos de polifosfato com cátions e metais pesados. Em adição, a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência ou tolerância de alguns microrganismos a metais pesados reforça o seu potencial biotecnológico na remoção destes elementos (VANLOOSDRECHT, 1997; MINO et al., 1998; KEASLING et al., 2000; KULAEV, 2000).

1.3.3. Fosfatases

O fósforo é um elemento essencial para alguns organismos, que o podem absorver na forma de um ânion ortofosfato (P_i ; $H_2PO_4^-$ ou HPO_4^{2-}). A fosfatase ácida é uma enzima chave em regulação do metabolismo em células. A deficiência de fósforo inorgânico causa uma significativa elevação intracelular e extracelular da atividade da fosfatase ácida em várias plantas (ELLIOTT et al., 1986; GOLDSTEIN, 1988; LEFEBVRE et al., 1990) e fungos (TADANO e SAKAI, 1991).

As fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos fosfomonoésteres, as quais estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido encontradas em animais, vegetais e em microorganismos. Estas enzimas são divididas em 3 grupos principais: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases (ELLIOTT et al., 1986; GOLDSTEIN, 1988; LEFEBVRE et al., 1990; TADANO e SAKAI, 1991) .

As fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e utilizam como substratos compostos com baixa massa molecular (por exemplo: açúcares fosforilados). Contrastando com as fosfatases ácidas, as alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 9,0 e também atuam em substratos de baixa massa molecular relativa. No entanto, há necessidade de íons divalentes, como magnésio, cobalto ou manganês, para catálise (TIBBETT et al., 1998).

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma grande família de enzimas (> 100)

responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. São estruturalmente diversas, incluindo a tipo citoplasmática e a tipo receptor com a capacidade de transmitir sinais diretamente a enzimas de membrana e citoplasma, controlando diversos processos celulares (ZHANG, 1996).

As fosfatases representam enzimas que permitem o acesso ao fósforo orgânico do meio ambiente. Dessa forma, as concentrações de fósforo disponível atuam como reguladores da expressão das enzimas nos fungos, o que caracteriza tais enzimas como induzíveis. Geralmente, ocorre uma forte relação inversa entre a concentração do fósforo do meio e fosfatase. Em ambientes com baixas concentrações de fósforo induzem maiores expressões (LEFEBVRE et al., 1990).

1.3.4. Ultraestrutura

Estruturalmente, fungos são organismos eucarióticos e, portanto exibem, citologicamente, as características desse grupo de organismos e, de um modo geral, estão evidenciadas através da microscopia óptica. A introdução da microscopia eletrônica na década de 60 para análise estrutural de fungos gerou uma nova visão sobre esse tipo celular. Aspectos da esporangiosporogênese, morfologia e germinação de esporos de espécies de *Rhizopus*, *Mucor rouxii*, *Gilbertella persicaria* e *Mycotypha* (BARTINICKI-GARCIA et. al., 1968a e 1968b; BRACKER, 1968; YOUNG, 1969).

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 (anos 60), microanálise por raio X, criopreservação e técnicas imunológicas foram aperfeiçoadas. A rápida evolução do surgimento de microscópios mais modernos, como o de transmissão de alta resolução e o de varredura ambiental, permite, atualmente, inclusive, o estudo de amostras frescas e o mínimo de manipulação possível durante o processamento (KLOMPARENS, 1990; COLLINS et al., 1993).

A caracterização da ultraestrutura de fungos é fundamental para o entendimento de alguns aspectos do desenvolvimento celular, como por exemplo, germinação de esporos, interações hospedeiros-patógenos, comportamento nuclear, estudos de organelas e estudos sobre a organização celular. A avaliação ultraestrutural auxilia a taxonômia e, conseqüentemente, aumenta o conhecimento sobre processos de controle de disseminação, controle de atividades economicamente importantes e patogenicidade, caracteres esses tão comuns a esse grupo de organismos (HOLLENBERG e ERICKSON, 1973; MIMS, 1990).

Com o advento da microscopia eletrônica, foi possível elucidar alguns aspectos únicos da estrutura celular dos fungos, como, por exemplo, a membrana citoplasmática, processos de interação fungos parasitas de plantas, identificação de elementos estruturais para estudos taxonômicos e identificação dos aspectos da estrutura fina de esporos (KLOMPARENS, 1990; JONES et al. 1989).

Condições ambientais relativas a fontes de carbono, fósforo, nitrogênio, fósforo, tensão de oxigênio, pH, temperatura, intensidade de radiação, e microelementos influenciam o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento celular, a diferenciação, formação de estruturas reprodutivas e diferenciação sexual (GARRAWAY e EVANS, 1984; GRIFFIN, 1994; AOKI e NIRENBERG, 1999; KANA-UCHI e KUKATSUI, 1999; KIHARA et al., 1999; KITAMOTO et al., 1999; THAM et al., 1999).

1.3.5. Cádmio e Poluição

Com o vertiginoso crescimento da população humana, atualmente com mais de 6 bilhões de habitantes, os níveis de poluição aumentaram e, assim, vários ecossistemas foram destruídos. A água, não importando se de rios, lagoas ou do mar, é um dos ambientes mais afetados pela atividade humana. Observou-se que, após a Segunda Guerra Mundial, a preocupação e o interesse com as questões ambientais vêm aumentando, de forma cada vez mais acentuada, com o passar das décadas. Vários grupos ao redor do planeta vêm

realizando pesquisas que visam a avaliar e a diminuir os impactos da poluição na biosfera.

Paralelamente, com o desenvolvimento dos processos industriais, surgiram novos compostos químicos sintéticos que, por sua vez, foram lançados no meio ambiente indiscriminadamente. Muitos destes compostos, chamados xenobióticos, ocorrem na natureza (Exemplo: hidrocarbonetos do petróleo, metais pesados) ou são suficientemente similares a estes, estando sujeitos ao metabolismo microbiano. Outros, entretanto, como os pesticidas (PCBs), apresentam estruturas moleculares e seqüências químicas que não são reconhecidas pelas enzimas degradativas já existentes entre a microbiota autóctone. Estes compostos que resistem à biodegradação ou não são metabolizados completamente, acumulando-se no ambiente, podem ser considerados recalcitrantes ou persistentes. Desta forma os poluentes contaminam o ambiente e podem interferir no funcionamento normal da biosfera (LINCH e HOBBIE, 1988; ATLAS e BARTHA, 1992).

No entanto, estes poluentes xenobióticos podem ser removidos do ambiente por uma variedade de vias biológicas, químicas e físicas. As técnicas de biorremediação, processo em que os microrganismos são utilizados para eliminação ou desintoxicação do ambiente contaminado por xenobióticos, oferecem novas possibilidades para acelerar a degradação destes poluentes, quer adicionando-se os nutrientes necessários à população microbiana natural, quer adicionando-se culturas bacterianas mistas ou puras, que apresentem as vias metabólicas, que permitam a rápida metabolização do contaminante (WHITE et al, 1995).

Como existem restrições à introdução de microrganismos no ambiente, é necessário estabelecer o potencial de biorremediação inerente às espécies autóctones de um determinado local. Por isso, faz-se necessário estudar os processos de biodegradação ou biotransformação de compostos xenobióticos e a biodiversidade das comunidades microbianas responsáveis por estes processos no meio ambiente ao qual já estão adaptadas. (MADSEN, 1991).

A presença de contaminantes xenobióticos nos ecossistemas naturais representa uma forma de seleção relativamente “recente”, influenciando na evolução de novas vias

catabólicas. Observações à respeito da rapidez com que estes organismos metabolizam estes novos compostos, podem nos dar uma idéia das taxas da evolução microbiana. Um passo importante é entender como estes processos conferem a capacidade degradativa de populações bacterianas em ambientes naturais (BROCK et al, 1994).

Mas, em geral, os microrganismos capazes de degradar um xenobiótico específico são encontrados com maior freqüência nos locais contaminados previamente com o poluente. As vias de degradação destes compostos por microrganismos específicos e a organização genética dos genes envolvidos na degradação dos mesmos têm sido intensivamente estudadas (LINCH e HOBBIE, 1988; MORGAN e WATKINSON, 1994; SMITH, 1994).

Os metais pesados, dentre os vários poluentes existentes, têm recebido atenção especial, uma vez que alguns são extremamente tóxicos, para uma grande variedade de organismos, mesmo em quantidades muito baixas, da ordem de mili- ou até mesmo microgramas. Compreendem 40 elementos com densidade superior a 5 g/cm³. Alguns, como ferro, em pequenas quantidades, são elementos essenciais ao crescimento tanto de organismos procariotas quanto de eucariotas (HUGHES e POOLE, 1989). No entanto, outros metais, como o cádmio, não possuem função biológica conhecida (GADD, 1992) e são extremamente tóxicos, mesmo em concentrações muito baixas.

O cádmio é o elemento de número 48 na tabela periódica, possui peso atômico 112,4, seu íon 2⁺ pode se associar a ligantes tanto inorgânicos quanto orgânicos. A concentração de cádmio na crosta terrestre é de 0,18 ppm (partes por milhão). O metal não existe puro na natureza, mas os minerais contendo cádmio estão associados com minérios de zinco (BABICH e STOTTZKY, 1978). Entre as principais aplicações do cádmio estão a produção de baterias (Ni-Cd), a fabricação de pigmentos para materiais cerâmicos, além de seu uso como agente de estabilização do PVC e em processos de galvanoplastia.

O metal se estabelece como poluidor através de várias fontes, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Fontes causadoras de poluição por cádmio (MESQUITA, 1993)

Meio poluído	Fonte
Ar	Mineração e processamento de minérios
	Fabricação de pigmentos
	Fabricação de baterias
	Combustão de carvão e óleos
	Incineração de resíduos
Solo	Deposição atmosférica
	Águas residuais de minas
	Lama residual de fertilizantes
	Fungicidas e pesticidas
Águas	Deposição atmosférica
	Águas residuais de minas
	Resíduos de tratamentos de efluentes
	Efluentes industriais
	Lixiviação de "Landfills"

O cádmio é um elemento altamente tóxico para seres humanos, podendo ser absorvido através dos tratos respiratório e intestinal. A intoxicação aguda tem como conseqüências náuseas, salivação, vômitos, dores abdominais e diarreia. As intoxicações crônicas, resultado de longos períodos de exposição, podem levar a disfunção renal, anemia, bronquite crônica, efizema pulmonar, arterioesclerose, hipertensão e câncer Um dos casos mais graves de contaminação por cádmio ocorreu no Japão, onde arroz e águas

contaminados por efluentes de uma mina de zinco afetaram centenas de pessoas. A contaminação levou ao surgimento de uma doença conhecida como Itai-Itai, caracterizada pela degeneração progressiva dos ossos. O cádmio substitui o cálcio nos ossos, de modo que ficam fragilizados e quebram. (HALLENBICK, 1984; BERNARD e LAUWERYR, 1984).

Um número limitado de estudos tem focalizado a influência de metais pesados em microrganismos em seu habitat natural, contudo o metal pode se depositar e acumular em diversos tipos de habitats microbianos (solos, oceanos, estuários, lagos e rios), e dessa forma entrar na base da cadeia alimentar. Alguns estudos demonstram os efeitos do cádmio sobre atividades enzimáticas, fosforilação oxidativa, taxas fotossintéticas, permeabilidade e integridade da membrana celular e síntese de proteínas (BABICH e STOTZKY, 1978)

É importante ressaltar que diversos fatores ambientais influenciam na toxicidade de metais pesados, pode-se destacar o pH, o suprimento de nutrientes e oxigênio, presença de outros íons metálicos e agentes quelantes e a concentração celular (HUGHES e POOLE, 1989; TREVORS et al, 1986).

1.3.6. Remediação de Metais.

Em geral, atualmente o tratamento de ambientes contaminados com metais envolve processos físico-químicos de floculação e/ou precipitação, eletrólise, cristalização e adsorção. Contudo, estes processos são caros e produzem novos resíduos, apenas transportando o problema de um lado para outro. A busca por soluções mais baratas e definitivas levou ao desenvolvimento de tecnologias baseadas na utilização de microrganismos, como os agentes de remoção dos metais pesados (VALDMAN e LEITE, 2000; GOMES et al, 1998).

Embora, virtualmente, todo material biológico apresente habilidade para captação de metais, várias pesquisas vêm sendo direcionadas para o uso de sistemas microbianos, onde tanto biomassa viva como morta são empregadas. Muitos microrganismos, incluindo

bactérias, algas e fungos, possuem a habilidade de remover metais pesados do meio ambiente (Tabela 2). A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acumulação, podem variar amplamente de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo a linhagem. Células, produtos excretados, parede celular e polissacarídeos têm potencial para remover metais de solução. Fatores externos como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade de acumulação (NAKAJIMA e SAKAGUCHI, 1986; CRIST et al, 1988; COTORAS et al, 1992; FAISON et al, 1990; KUHN e PFISTER, 1990).

Os termos biossorção e bioacumulação são processos de aplicação tecnológica do que vem ocorrendo na natureza por milhares de anos. Biossorção é definida como a remoção de íons metálicos por meio de adsorção passiva ou complexação por biomassa microbiana ou material derivado desta (ECCLES, 1995). Já o termo bioacumulação gera algumas divergências. Para ECCLES (1995), bioacumulação refere-se a todos os processos responsáveis pela remoção de metais por células vivas, deste modo incluindo a biossorção junto com os mecanismos ativos de acúmulo intracelular e bioprecipitação. A definição apresentada (GOMES et al 1988) considera que bioacumulação envolve exclusivamente os mecanismos dependentes do metabolismo celular. Porém, ambos os autores concordam que em um primeiro instante há o predomínio da biossorção (rápida), seguida ou não pelos mecanismos de bioacumulação (Tabela 2). A remoção de metais empregando microrganismos selecionados tem se tornado bastante promissora, já que os mesmos podem apresentar alta seletividade e taxa de remoção. Seu emprego também apresenta a vantagem de possuírem potencial para regeneração da biomassa, possibilitando a reutilização em novas etapas de remoção, após a recuperação do metal captado (Tabela 2) (ECCLES, 1995, GOMES, 1988; MESQUITA, 1993).

Tabela 2: Exemplos de acúmulo de metais por microorganismos (MESQUITA, 1993)

Tipo	Microorganismo	Metal	Referências
Bactéria	<i>Streptomyces sp.</i>	Prata	VOLESKY e HOLAN, 1995 e MESQUITA, 1993
	<i>Bacillus subtilis</i>	Cádmio / Manganês / Ouro	
	<i>Zooglea sp.</i>	Cobalto / Cobre / Urânio	
	<i>Citrobater sp.</i>	Chumbo / Cadmio / Urânio	
	<i>Bacillus sp.</i>	Cadmio / Cobre / Chumbo	
	<i>Micrococcus luteus</i>	Cádmio	
Alga	<i>Chlorella vulgaris</i>	Cádmio / Zinco	TING et al, 1989 e LEITE et al., 1993
	<i>Chlorella homosphaera</i>	Cádmio / Zinco	
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Cádmio / Zinco	
Fungo	<i>Aspergillus niger</i>	Cádmio / Cobre / Ouro / Lantâneo	KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Cádmio / Cobre / Zinco	
	<i>Penicillium sp.</i>	Alumínio / Chumbo / Estanho	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Chumbo / Tório / Urânio	
	<i>Rhizopus arrizus</i>	Cromo / Manganês / Mercúrio	
Levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cádmio / Cobre / Urânio	KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995

Adicionalmente, o esquema apresentado na Figura 1 mostra os princípios básicos envolvidos na utilização tecnológica da capacidade de remoção de metais por biomassa microbiana e sua posterior recuperação.

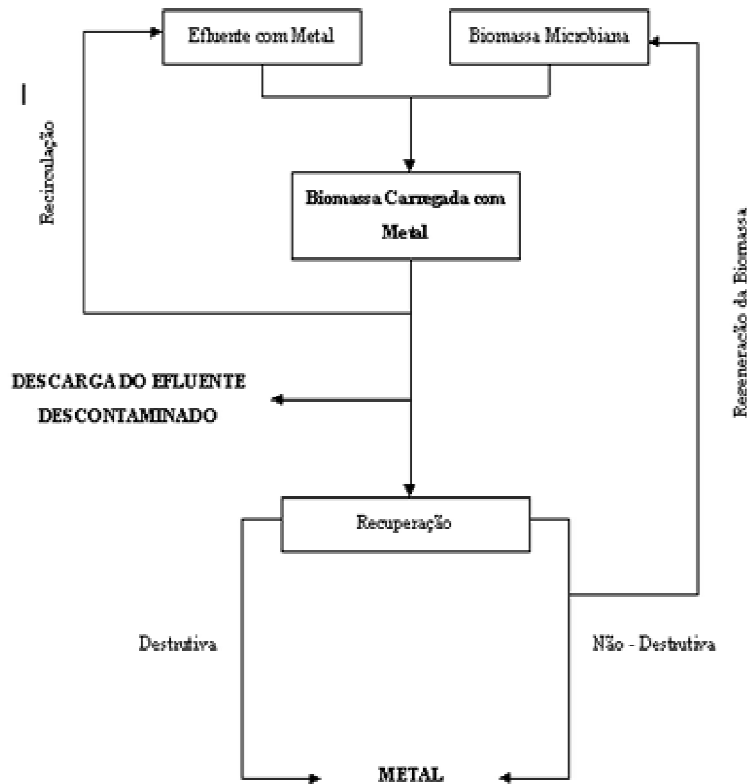


Figura 1: Esquema básico envolvido na remoção e recuperação de metais de solução aquosa por microrganismos (GADD; 1988).

1.3.7. Mecanismos de Remoção de Metais

Os microrganismos exibem uma grande capacidade de captação e acúmulo de metais através de processos que podem ser ou não dependentes do metabolismo.

A acumulação de metais pesados, por mecanismos independentes do metabolismo celular, se dá através de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e outros materiais associados à face externa da membrana

celular. A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas (GADD, 1992).

As superfícies celulares são estruturas aniônicas (que apresentam carga negativa) devido à presença de grupos ionizáveis, como: carboxilas, hidroxilas e fosfatos, que apresentam capacidade de interagir e reter os cátions (grupos com carga positiva) metálicos. A captação de metais pela superfície celular é influenciada pelo pH do meio devido à neutralização dos grupos aniônicos envolvidos. Em geral, o aumento dos valores de pH da solução metálica, leva a um aumento na absorção do metal (HUGGES e POOLE, 1989 e HUNT, 1986).

Por outro lado, o transporte de íons de metais pesados através da membrana celular e sua acumulação intracelular são dependentes do metabolismo, ou seja, ocorrem somente em células vivas, capazes de gerar energia. A remoção de íons metálicos por este tipo de mecanismos é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físico-química, em contrapartida maiores quantidades de metal podem ser acumuladas (GADD, 1988 TING et al., 1989 GADD, 1990; GADD, 1992a).

Os mecanismos de transporte envolvidos na acumulação de metais pesados são pouco conhecidos. Uma das possibilidades será a de que os metais pesados podem ser captados pelos sistemas de transporte de metais essenciais para o desenvolvimento microbiano (GADD, 1988). Uma vez dentro da célula, os íons metálicos podem se localizar em organelas, ou ligados a proteínas, deslocando os íons adequados de suas posições, prejudicando as funções metabólicas (GADD, 1992b).

Células vivas ou mortas podem ser empregadas nos processos de captação de metais. Sistemas utilizando microrganismos vivos têm sido aplicados principalmente na descontaminação de esgotos e águas residuais, havendo assim, além da biodegradação de resíduos orgânicos e nitrogenados, a remoção de algumas formas solúveis de metais

pesados que se encontram em baixos níveis de concentração. Processos contínuos e em batelada, utilizando células vivas de culturas puras também têm sido estudados. Bactérias produtoras de exopolissacarídeos como *Zooglea ramigera* e *Arthrobacter viscosus* apresentaram bons resultados na captação de cobre e cádmio, respectivamente (NORBERG e RYDIN, 1984 e SCOTT et al., 1986). CAMPBELL e MARTIN (1990) empregaram fungos filamentosos, isolados de solos contaminados, na remoção de cádmio obtendo eficiência de 97%.

A biomassa pode ser utilizada em seu estado natural ou modificada por tratamentos físicos e/ou químicos, de modo a aumentar a eficiência da absorção. A utilização de biossorventes, ou seja, a biomassa que apresenta apenas o mecanismo biossorção (independente do metabolismo), é geralmente utilizada devido ao baixo custo do processo de obtenção do material biológico, o processo não ser regulado pelas restrições fisiológicas, tem rápida remoção do meio aquoso, e a possibilidade de se imobilizar a biomassa (HOLBEIN, 1990).

Dessa forma, como alternativa eficiente para lidar com problemas ambientais, a biorremediação compreende técnicas e metodologias como uso e aplicação de microrganismos, que podem oferecer soluções práticas em função da alta especificidade, efetiva de custos e uso em larga escala *in situ* e *ex situ*.

1.4. Referências Bibliográficas

AHN K, KORNBERG A. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. **J. Biol. Chem.**, v. 15;265(20):11734–11739, 1990.

AIKING, H., STIJNMAN, A., GARDEREN, C.V., HEERIKHUIZEN, H. V. AND RIET, J.V. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 47(2):374–377, 1984.

AKIYAMA M, CROOKE E, KORNBERG A. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. **J Biol Chem.**, v. 268(1):633–639, 1993.

AKIYAMA M, CROOKE E, KORNBERG A. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the ppk gene and membrane location of the protein. **J Biol Chem.**, v. 267(31):22556–22561, 1992.

ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. - **Introductory Mycology**. New York, John Wiley e Sons publishers, 1996. 233p.

AOKI J e NIREUBERJ H. I. *Fusarium globosum* from subtropical Japan and the effect of different light conditions on its conidogenesis. **Mycoscience**, Tokyo, v. 40, 1-9, 1999.

ARCHIBALD FS, FRIDOVICH I. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. **Arch. Biochem. Biophys.** , v. 215(2):589–596, 1982.

ATLAS, R.M., BARTHA, R. **Microbial Ecology. Fundamentals and applications**. 3 ed., The Benjamin/ Cummings Publ. Co., Inc., CA USA. 1992, 563p.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Effects of cadmium on the biota: Influence of environmental factors. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 23, 54-117, 1978.

BARAK, Y; RIJN, J.V. Relationship between nitrite reduction and active phosphate uptake in the phosphate-accumulation denitrifier *Pseudomonas sp.* strain JR 12. **Appl. Environ. Microbiol.** v..66 (12), 5236-5240, 2000.

BARTINICKI-GARCIA, S. - Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 22, 87-108, 1968a.

BARTNICKI-GARCIA, S., NELSON N., COTA ROBLES, E. - Electron microscopy of spore germination and cell wall formation in *Mucor rouxii*. **Arch. Microbiol.**, v. 63, 242-255, 1968b.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, v. 40 (2), 143-152. 1984.

BOLAR, J., et al. Increased resistance to scab of endochitinase transgenic McIntosh apple lines. **Phytopathology**, v. 90: 72-77. 2000.

BOLESCH, D.G; KEASLING, J.D. Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. **J. Biol. Chem.** v. 275 (43), 33814- 33819, 2000.

BRACKER, C.E. - The ultrastructure and development of sporangia in *Gilberteria persicaria*. **Mycologia**, v. 60, 1016-1067,1968.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 7 ed, Prentice Hall, NJ, USA,1994, 909p.

CAMPBELL, R.; MARTIN, M.H. Continuous flow fermentation to purify waste water by removal of cadmium. **Wat. Air Soil Pol.**, v. 50, 397-408, 1990.

CARSOLIO C., et al. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65:929-935, 1999.

COHEN-KUPIEC, R., et al. Molecular characterization of a novel b-1,3 exo-glucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Gene** v. 226, 147-154, 1999.

COLLINS, S.P.; POPE, R.K.; SCHEETZ, R.W.; RAY, R.I.; WAGNER, P.A. e LITTLE, B.J. - Advantages of enviromental scanning electron microscopy in studies of microorganisms. **Microsc. Res. Tech.**, v. 25, 398-405, 1993.

CONAMA – Conselho de Política Ambiental. Deliberação Normativa nº20, **Diário Oficial da União**. p. 11356-11357 , 30 de julho de 1986.

COTORAS, D et al. Sorption of metal ions by whole cells of *Bacillus* and *Micrococcus*. **Environ. Technol.**, v. 13, pp. 551-559, 1992.

CRIST, R.H. Interactions of metals and protons with algae. **Env. Sci. Technol. USA.** v. 22, 755-760, 1988.

DALY, J. A., ERTINGSHAUSEN G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifChem". **Clin Chem.**, 18(3), 263–265, 1972.

DE SOUZA, W. - **Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica.** Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 2000. 134p.

ECCLES, H. Removal of heavy metals from effluent streams - Why select a biological process?. **Intern. Biodeter. Biodegrad**, v. 44(5), 5-16, 1995.

ELLIOTT, S.; CHANG, C.; SCHWEINGRUBER, M.E.; SCHALLER, J.; RICKLI, E. E.; CARTON, J. – Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. **J. Biol. Chem.**, v. 261, 2936 – 2941, 1986.

FAISON, B.D. Binding of dissolved strontium by *Micrococcus luteus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56(12), 2.649-3.656, 1990.

FELLENBERG, G. - Introdução aos problemas da poluição ambiental. **Ed. Pedagógica e Universitária.** São Paulo. 1990. 243 p.

GADD, G.M. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: REHM, H.J. (ed): **Biotechnology - A comprehensive treatise.** Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. 6B. pp. 401-433, 1988.

_____. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, 834-840, 1990.

_____. Biosorption. **J. Chem. Technol. Biotech.**, v. 55(3), 302-304, 1992a.

_____. Microbial control of heavy metal pollution. In: ZRY, J.C. et al. (ed.): **Microbial Control of pollution.** 58th Symposium of the Society for General Microbiology. 1992b.

GARRAWAY, M. O. e EVANS, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. John Willey e Sons Incorporation Publishers. 1984. 401p.

GOLDMAN, M. H. S., GOLDMAN, G. H. *Trichoderma harzianum* transformant has high extracellular alkaline proteinase expression during specific mycoparasitic interactions. **Genet. Mol. Biol.**, v.21, 189-195. 1998.

GOLD-STEIN, A. H.; DANON, A.; BAERTLEIN, D. A.; McDANIEL, R. G. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. **Plant Physiology**. v. 87, 711 – 715, 1988.

GOMES, N.C.M.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; SAVVAIDIS, I. Metal bioremediation by microorganisms. **Rev. Microbiol.**, v. 29(2), 85-92, 1998.

GREENFIELD, N. J.; HUSSAIN, M.; LENARD, J. Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a P-nuclear magnet resonance study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 926, 205 – 214, 1987.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. John Willey e Sons Incorporation Publishers. 1994. 458p.

GUENOUNE D, GALILI S, PHILLIPS DA, VOLPIN H, CHET I, OKON Y, KAPULNIK Y. The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. **Plant Sci**. v. 160(5), 925-932, 2001.

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

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., M. LORITO, G. E. *Trichoderma* spp. An opportunistic avirulent plant symbionts. **Nature Microbiol. Rev.**, v. 2, 43-56, 2004.

HAROLD, F.M. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. **Bacteriol. Rev.**, v. 30, 772-793, 1966.

HOLBEIN, B.E. Immobilization of metal-binding compounds. In: VOLESKY, B. (ed.): **Biosorption of heavy metals**. CRC Press. Boca Raton. pp. 327-338, 1990.

HOLLENBERG, M. J. ERICKSON, A..M. The scanning electron microscope: potencial usefulness to biologists. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 21, 109-130, 1973.

HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. **Metals and microorganisms**. Londres. Chapman and Hall Ltd. 1989. 356p.

HUNT, S. Diversity of biopolymer structure and its potential for ion-binding applications. In: ECCLES, H.; HUNT, S. (ed.): **Immobilization of ions by bio-sorption**. Chinchester: Ellis Horwood, pp. 91-104, 1986.

JOH, T., MALICK, D. H., YAZAKI, J. AND HAYAKAWA, T. Purification and characterization of secreted acid phosphatase under phosphate-deficient condition in *Pholiota nameko*. **Mycoscience**. v. 37, 65–70, 1996.

JONES, J. K.; STRATFORT, J.A.; WATHERHOUSE, K.S.; VOGT, N.B. – Organic contaminants in welsh soils: polynuclear aromatics hydrocarbons. **Environ. Sc. Technol.**, v. 23, 540-550, 1989.

KANA-UCHI, A e KUKATSUI, T. - Light induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces termipes*. **Mycoscience**, v. 40, 349-351, 1999.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Biores. Technol.**, v. 53, 195-206, 1995.

KEASLING, L. D. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**, v.65 (63), 324-331, 2000.

KEASLING, L.D., VAN DIEN, S.J., TRELSTAD, P., RENNINGER, N., MCMAHON, K. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90(15), 7029–7033, 1993.

KIHARA, J.; WATANABE, Y.; HONDA, Y. - Suppression and reactivation of uv-induced

sporulation by blue light in *Bipolaris oryzae*. **Mycoscience**, v.40, 363 - 366, 1999.

KITAMOTO, Y.; AKITA, K.; HORIKOSHI, T. - Effects of high-temperature treatment on two essential light processes and an intervening dark process in photoinduced pileus primordium formation of a Basidiomycete, *Favolus arcularius*. **Mycoscience**, v. 40, 103-108, 1999.

KLIONSKY DJ, HERMAN PK, Emr SD. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. **Microbiol Rev.** v. 54(3),266–292, 1990.

KLOMPARENS, K. L. - The Development and application of ultrastructural research in mycology. **Mycopathologia**, v. 109, 139-148, 1990.

KORNBERG, A., RAO, N.N., AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, 89-125, 1999.

KUHN, S. P., PFISTER, R. M. Accumulation of cadmium by immobilized *Zoogloea ramigera* 115. **J. Ind. Microbiol.**, v. 6, 123-138, 1990.

KULAEV, I., KULAKOVSKAYA, T. Polyphosphate and phosphate pump. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, 709-734, 2000.

KULAEV, I.S. Biochemistry and biotechnology of inorganic polyphosphates. **Biochemistry**, v. 65(3), 269-270, 2000.

KULAEV, I.S., VAGABOV, V.M., KULAKOVSKAYA, T.V., LICHKO, L.P., ANDREEVA, N.A., TRILISENKO, L.V. The development of an Belozersky's Ideas in polyphosphate biochemistry. **Biochemistry**, v.65(3), 271-278, 2000.

KULAEV, I; KULAKOVSKAYA, T. Polyphosphate and phosphate pump. **Annu. Rev. Microbiol.** 54, p. 709-734, 2000.

KUMBLE, K.D., KORNBERG, A. Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. **J. Biol. Chem.**,v. 271(43), 27146-27151, 1996.

_____, A. Inorganic polyphosphate in mammalian cell and tissues. **J. Biol.**

Chem., v. 270 (11), 5818-5822, 1995.

KURODA, A., OHTAKE, H. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. **Biochemistry**, v.65(3), 304-308, 2000.

KURODA, A., KORNBERG, A. Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Sci.**, v. 94 (2), 439-442, 1997.

LEFEBVRE, D. D., DUFF, S. M. G., FIFE, C. A., JULIEN-INALSINGH, C. AND PLAXTON, W. C. 1990. Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. **Plant Physiol.**, v. 93, 504–511. 1990.

LEITE, S. G. F. Cadmium uptake and its effect on the growth of *Chlorella homosphaera* and *Scenedesmus quadricauda* cells in laboratory conditions. **Rev. Microbiol.**, v. 24(1), 54-58, 1993.

LINCH, J.M. e HOBBIE, J.E. (Eds) **Micro-organisms in action: concepts and applications in microbial ecology**. Blackwell Scientific Publ., UK. pp. 332-347. 1988.

LORITO, M.; WOO., S.L.; GARCÍA FERNÁNDEZ, I.; COLUCCI, G.; HARMAN, G.E.; PINTOR-TORO, J.A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C.B.; ZOINA, A.; TUZUN, S. AND SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, 7860-7865. 1998.

MACASKIE, L. E.; DEAN, A. C .R. Microbial metabolism, desolubilization and deposition of heavy metals: Metal uptake by immobilized cells and application to the detoxification of liquid wastes. **Biol. Waste Treat.**, v. 67, 159-201, 1989.

MADSEN, E.L. Determining in situ biodegradation. facts and challenges . **Environ. Sc. Technol.**, v. 25, p. 1663-1673, 1991.

MAIER, S.K; SCHERRER, S; LOESSNER, M.J. Long- Chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65 (9), 3942-3949, 1999.

MCGRATH, J.W; QUINN, J.P. Intracellular accumulation of polyphosphate by the *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66(9), 4068-4073, 2000.

MESQUITA, L. M. S. **Remoção de ions cádmio de soluções por *Micrococcus luteus***. Tese de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro, 1993. 123p.

MIMS, C. W. - Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, v. 83, 1-19. 1991.

MINO, T; VANLOOSDRECHT, M.C.M; HEIJNEN, J.J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. **Water Res.**, v. 32, 3193-3207, 1998.

MORGAN, P. e WATKINSON, R.J.. Biodegradation of components of petroleum. In: RATLEDGE, C. (Ed) **Biochemistry of Microbial Degradation** Kluwer Academic Publishers. London, UK. 1994. 590p.

MORPER, M. Anaerobic Sludge - A powerful and low-cost sorbent for heavy metals. In ECCLES, H.; HUNT, S. (ed.): **Immobilization of ions by bio-sorption**. Chinchester: Ellis Horwood, pp. 91-104, 1986.

NAKAJIMA, A.; SAKAGUSHI, T. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, 59-64, 1986.

NEIDHARDT, F. C.; BLOCH, P. L.; SMITH, D. F. Culture medium for Enterobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 119(3), 736-747, 1974.

NIES, D. H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. **Plasmid**, v. 27, 17-28, 1992.

NORBERG, A.; RYDIN, S. Development of a continuous process for metal accumulation by *Zoogloea ramigera*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 26, 265-269, 1984.

OMERO C, HORWITZ BA, CHET I. A convenient fluorometric method for the detection of extracellular N-acetylglucosaminidase production by filamentous fungi. **J. Microbiol. Methods**, v. 43(3):165-9, 2001.

OMERO, C., INBAR, J., ROCHA-RAMÍREZ, V. , HERRERA-ESTRELLA, A. , CHET, I., HORWITZ, B. A. protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. **Mycol. Res.**, v. 103:1637-1642, 1999.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 23, 23-54, 1985.

PEVERLY, J. H.; ADAMEC, J.; PARTHASARATHY, M. V. Association of potassium and some other monovalent cations with occurrence of polyphosphate bodies in *Chlorella pyrenoidosa*. **Plant Physiol.**, v. 62(1):120–126. Jul. 1978.

PINTO, G. A. S.; LEITE, S. G. F.; dA CUNHA, C. D.; MESQUITA, L. M. S. – Aplicação de microorganismos no tratamento de resíduos: a remoção de metais pesados de efluentes líquidos. **Rev. Cient. Cult. Universidade Estácio de Sá**. Cap. 2002.

RACHLIN, J. W., JENSEN, T. E., BAXTER, M., JANI, V. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 11(3), 323–333, 1982.

RAGUZZI, F., LESUISSE, E., CRICHTON, R. R. Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 231(1):253–258, 1988.

RAO, N.N; LIU, S; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: The phosphate regulon and the stringent response. **J. Bacteriol.**, v. 180 (8), 2186-2193, 1998.

_____ Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 178 (5), 1394-1400, 1996.

RASHID, M. H., RUMBAUGH, K., PASSADOR, L., DAVIES, D. G., HAMOOD, A. N., IGLEWSKI, B. H., KORNBERG, A. Polyphosphate kinase is essencial for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97(17), 9636-9641, 2000.

RASHID, M.H; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming,

and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97(9), 4885-4890, 2000a.

RASHID, M.H; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. **J. Bacteriol.**, v. 182 (1), 225-227, 2000b.

REED, R. H; GADD, G. M. Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae, p. 105–118. In A. J. Shaw (ed.), **Heavy metal tolerance in plants. CRC Press, Inc.**, Boca Raton, Fla., 1985. 345p.

SCOTT, J. A.; PALMER, S. J. Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. **Biotechnol. Letters**, v. 10, 21-24, 1988.

SCOTT, J. A.; PALMER, S. J.; INGHAM, J. Microbial metal adsorption enhancement by naturally excreted polysaccharide coating. In: ECCLES, H.; HUNT, S. (ed.): **Immobilization of ions by bio-sorption**. Chinchester: Ellis Horwood, pp. 81-88, 1986.

SCOTT, J. A; PALMER S.J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 33(2):221–225. Mai. 1990.

SHARFSTEIN ST, KEASLING JD. Polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 745, 77–91, 1994.

SHIBA, T; TSUTSUMI, K; ISHIGE, K; NOGUCHI, T. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. **Biochemistry**, v.65(63), 315-323, 2000.

SHORESH, M, GAL-ON, A, CHET, I. *Trichoderma* inoculation potentiates the expression of the protein kinase, TIPK, during pathogen infection. **Phytopathology**, 2006.

SHORESH, M, YEDIDIA, I, CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v. 95, 76-84, 2005.

SMITH, M.R. The Physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In: RATLEDGE, C. (Ed.). **Biochemistry of microbial degradation**. Kluwer Acad. Publishers, London, UK. 590p. 1994.

TADANO, T. e SAKAI, H. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus – deficient conditions. **Soil Sc. Plant Nutrient**. v. 37, 129 – 140, 1991.

THAM, L.; X.; MATSUHASHI, S.; KUME, T. Growth and fruit body formation of *Gracioderma lucidum* on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. **Mycoscience**, v. 40, 87 - 92, 1999.

TIBBETT, M.; GRANTHAM, K.; SANDERS, F.E.; CAIRNEY, J.W.G. – Induction of cold active acid phosphomonoesterase activity at low temperature in psychrotrophic ectomycorrhizal *Hebeloma spp.*. **Mycol. Res.**, v. 102(12), 1533 – 1539, 1998.

TING, Y. P.; LOWSON, F.; PRINCE, I. G. Uptake of cadmium and zinc by alga *Chlorella vulgaris*: Part 1. Individual ion species. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 34, 990-999, 1989.

TREVORS, J. T.; STRATTON, G. W.; GADD, G. M. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. **Can. J. Microbiol.**, v. 32, 447-464, 1986.

TZENG, C.M; KORNBERG, A. The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 275 (6), 3977-3983, 2000.

UNZ, R. F., SHUTTLEWORTH, K. L. Microbial mobilization and immobilization of heavy metal. **Curr. Op. Biotechnol.**, v. 7, 307 – 310, 1996.

URECH, K., DÜRR, M., BOLLER, T., WIEMKEN, A., SCHWENCKE, J. Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol.** v. 116(3), 275–278, 1978.

VAGABOV, V. M.; TRILISENKO, L. V.; KULAEV, I. S. Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v.65(3), 349-354, 2000.

VALDMAN, E., LEITE, S. G. F. Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum sp.* waste biomass. **Bioprocess. Eng.**, v. 22, 171-173, 2000.

VAN GROENESTIJN, VLEKKE, G. J. F. M., ANINK, D. M. E., DEINEMA, M. H., ZEHNDER, A. J. B. Role of cations in accumulation and release of phosphate by *Acinetobacter* Strain 210A. **Appl Environ. Microbiol.**, v. 54(12), 2894–2901, 1988.

VAN LOOSDRECHT, M. C., SMOLDERS, J. G., KUBA, T., HEIJNEN, J. J. Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.71(1-2), 109-116, 1997.

VAN VEEN, H. W., ABEE, T., KORTSTEE, G. J., PEREIRA, H., KONINGS, W. N., ZEHNDER, A. J. Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. **J. Biol. Chem.**, v. 269(47), 29509–29514, 1994.

VAN VEEN, HW, Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. **Biochemistry**. v. 33(7), 1766–1770, 1994.

VITERBO, A., HAREL, M., HORWITZ, B. A., CHET, I., MUKHERJEE, P. K. *Trichoderma* MAP-kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, 6241-6, 2005.

VITERBO, A. M., RAMOT, O., FRIESEM, D., MONTE, E., LLOBELL, A., CHET, I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Curr. Genet.**, v. 42(2), 114-122, 2002.

VITERBO, A., CHET, I. Isolation and characterization of HYD1, a new hydrophobin-like gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* involved in plant root colonization. **Phytopathology**, v. 83, 3435-367, 2006

VITERBO, A., HAREL, M., CHET, I. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238(1), 151-158, 2004.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnol. Prog.**, v. 11, 235-250, 1995.

WHITE, C, WILKINSON S.C;GADD G.M The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 35, 17-40, 1995.

WILLIAMS, J. W.; SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 6, 530–537, 1984.

WOOD, H.G, CLARCK, J.E. Biological aspects of inorganic polyphosphates. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, 253-260, 1988.

YEDIDIA, I., BEHAMOU, N., KAPULNIK, Y., CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *T. harzianum* strain T-203. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, 863-873, 2000.

YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65: 1061-1070, 1999.

YEDIDIA, I., SHORESH M., KEREM, Z., BENHAMOU, N., KAPULNIK, Y., CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 97, 567-576, 2002.

YEDIDIA, I., SRIVASTVA, A. K., KAPULNIK, Y. CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and soil**, v. 235, 235-242, 2001.

YOUNG, T.W.K. Electron and phase-contrast microscopy of spores in two species of genus *Mycotypha* (Mucorales). **J. Gen. Microbiol.**, v. 55, 243-249, 1969.

ZHANG; Z. Y., YANG, Y., LEAKEY, J. E., CERNIGLIA, C. E. Phase I and phase ii enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 138, 221-226, 1996.

CAPÍTULO 2

Trabalho a ser submetido ao Brazilian Journal of Microbiology

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ESTRUTURAIS DA TOXICIDADE DO CÁDMIO

EM *Trichoderma harzianum*

Adriana de Lima Freitas¹, Marcos Antônio Barbosa de Lima², Patrícia Mendes de Souza³, Gabrielle Ferreira de Moura⁴, Aline Elesbão do Nascimento^{5*}

1. Mestranda Programa Desenvolvimento de Processos Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Recife – PE;
2. Faculdades Integradas de Patos- FIP Paraíba;
3. Doutoranda Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco;
4. Graduanda Faculdade Maurício de Nassau – PE;
5. Universidade Católica de Pernambuco - Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais.

*Autor para correspondência: Rua Nunes Machado, 42, Boa Vista, Bloco J. Recife - PE.
CEP: 50.050-590/FAX: 081- 2119 4043.

ABSTRACT

Environmental contamination caused by toxic heavy metals represents a societal health risk. Contamination of soils with toxic metals is a frequent problem in industrialized areas. Cadmium is a major pollutant metal that is extremely toxic to organisms. The most dangerous characteristic of cadmium is that it accumulates throughout a lifetime. Biochemical and physiological understanding of heavy metals accumulation/removal determinants has

numerous additional biotechnological implications. Species of *Trichoderma* genus are recognized as "keystone or controller" organisms in due to their involvement in decomposition and nutrient cycling, their regulation of associated mycoflora and exhibit a high tolerance to heavy metals. This experiment was carried out to identify the biochemical and physiological behavior of *Trichoderma harzianum* order to characterize the tolerance and resistance processes to cadmium related to phosphatases activities, total proteins, morphology and ultrastructure. The fungi was grown in 1mM, 2mM and 3mM of cadmium. The morphological/ultrastructural aspects, characterized by using optical and scanning electron microscopy, were affected by the heavy metal presence and concentration. Same behavior was observed in the phosphatases activities. The total protein profile was also affected by cadmium presence. For *Trichoderma harzianum* the results obtained in this study revealed for the first time the cadmium effects on the aspects analyzed.

Key Words: *Trichoderma harzianum*, Cadmium, Phosphatases, Morphology, Ultrastructure.

RESUMO

A contaminação ambiental induzida por metais pesados tóxicos representa um risco à saúde humana e animal. Sendo um problema comum em áreas industrializadas. O cádmio é um dos principais metais poluidores com extrema toxicidade para inúmeros organismos. A característica mais perigosa do metal é seu potencial de acúmulo por longos períodos. O entendimento de aspectos bioquímicos e fisiológicos dos determinantes na acumulação/remoção de metais pesados tem enormes implicações biotecnológicas. Espécies do gênero *Trichoderma* são reconhecidas como organismos chaves ou controladores devido

ao seu envolvimento em processos de decomposição e ciclagem de nutrientes, sua regulação sobre a micoflora associada e que exibem tolerância para metais pesados. Esse experimento foi realizado para identificar os comportamentos bioquímicos e fisiológicos de *Trichoderma harzianum* de maneira a caracterizar os processos de tolerância e resistência ao cádmio relacionados à atividade de fosfatases, proteínas totais, morfologia e ultraestrutura. O fungo foi cultivado em presença 1mM, 2mM e 3mM de cádmio. Os aspectos morfológicos e ultraestruturais, caracterizados por microscopia óptica e eletrônica de varredura, foram afetados pela presença e concentração do metal. Comportamento semelhante foi observado na atividade das fosfatases. Adicionalmente, a presença do metal influenciou a biossíntese das proteínas celulares totais. Para *Trichoderma harzianum* os resultados obtidos nesse estudo revelam pela primeira vez os efeitos do cádmio sobre os aspectos analisados.

Palavras Chaves: *Trichoderma harzianum*, Cádmio, Fosfatases, Morfologia, Ultraestrutura.

INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por metais pesados é uma questão séria e mundial. O cádmio é um elemento traço não essencial e naturalmente de ampla distribuição, sendo encontrado em inúmeros tipos de ambientes, interagindo com o metabolismo de outros metais como cálcio, zinco, ferro e cobre e com proteínas ricas em grupos sulfidríla. A intoxicação pelo cádmio é observada em inúmeros sistemas vivos. Nos humanos são observadas alterações renais e no trato gastrointestinal, estando associados a doenças coronarianas, hipertensão, enfisema e doenças pulmonares crônicas (2, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 25, 31, 34, 36).

A literatura revela que os microrganismos são hábeis em sua afinidade por metais, podendo acumulá-los, utilizando versáteis mecanismos fisiológicos. Microrganismos altamente eficientes no seqüestro de íons metálicos incluem bactérias, fungos, actinomicetos e algas, os quais têm sido utilizados para remover metais de efluentes industriais e domésticos em grande escala. A biossorção é um processo no qual se utiliza a biomassa microbiana, viva ou inativada, na retenção, remoção e recuperação de metais de diferentes tipos de ambientes, via mecanismos passivos e/ou ativos (9, 17, 23, 35, 37, 38, 39, 40) .

A sobrevivência em um ambiente contaminado com metais pesados, ao longo do tempo, induziu nos microrganismos a habilidade de crescimento, a qual pode resultar de mecanismos intrínsecos ou induzidos (resistência/tolerância). A acumulação/remoção de metais é, em princípio, influenciada pelas propriedades das superfícies celulares e por diferentes tipos de atividades enzimáticas. Dessa forma, estudos que culminem com o entendimento do comportamento de microrganismos em presença de metais são fundamentais para emprego no processo de remediação (10, 12, 19, 22, 24, 26, 28, 30).

Considerando que o fungo *Trichoderma harzianum* é usado como agente de controle biológico, como modelo para fenômenos celulares, e que exhibe grande potencial de resistência contra agentes xenobióticos, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento fisiológico/estrutural, resultante do crescimento na presença de íons cádmio. Especificamente avaliando a morfologia, a ultraestrutura celular, o perfil de proteínas totais, bem como as enzimas associadas ao potencial de resistência/tolerância de *Trichoderma harzianum* ao cádmio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e Condições de Cultivo – O isolado de *Trichoderma harzianum* foi obtido do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco. O isolado foi mantido em meio Batata Dextrose Agar (BDA) a 5^o C. O fungo foi repicado em meio Sabouraud para a produção de esporos e incubado a 28°C por 6 dias, para a produção do pré-inóculo. Pré-inóculos correspondentes a discos de cultura, com um centímetro de diâmetro, foram inoculados em meio Sabouraud líquido, contendo cloreto de cádmio, preparado em água destilada e deionizada, pH 6,0, nas concentrações de 1mM, 2mM e 3mM. Culturas foram incubadas a 28°C sob agitação orbital de 250 Hertz, durante quinze dias. Amostras foram coletadas com 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo. Amostras controle foram crescidas em meio Sabouraud líquido sem cádmio. Todos os resultados foram expressos como média de cinco réplicas.

Atividade das Fosfatases Ácida e Alcalina - Amostras com 36 miligramas de micélio (peso úmido), foram obtidas nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo do fungo, na presença e ausência do cádmio. Após lavagem com água deionizada, as amostras foram incubadas em 3 mililitros da solução extratora. Para a fosfatase ácida, a solução continha 0,02M de tampão acetato de sódio (pH 4,5) e para a fosfatase alcalina 50 mM de Tris – HCL (pH 7,5), contendo 5% de glicerol. As amostras foram desintegradas em almofariz e pistilo por 5 minutos e em seguida macerados por 2 minutos, em banho de gelo. O extrato resultante foi centrifugado a 10000 Xg, por 10 minutos, a 4°C. A atividade enzimática dos extratos celulares foi realizada utilizando-se o Kit Lab-Test. A unidade de atividade enzimática utilizada foi a Unidade Internacional por Litro (U.I./L), que corresponde a quantidade de enzimas que catalisa o

desdobramento de 1µmol de substrato/minuto/litro de amostra. Os resultados correspondem à média de triplicatas. (JOH et al., 1996).

Efeitos do Cádmio sobre a Morfologia Celular - Amostras das células de *Trichoderma harzianum*, cultivadas nas diferentes condições experimentais, foram coletadas com auxílio de uma alça de platina, e depositadas diretamente na superfície de lâminas de vidro, contendo uma gota de Azul de Aman, e adicionada a lamínula. As amostras foram observadas sob Microscópio Nikon modelo Alphaphot 2 Y52, e fotografadas com máquina Nikon FDX-35.

Análise Ultraestrutural - Microscopia Eletrônica de Varredura – Amostras coletadas no intervalo de 15 dias de cultivo, foram lavadas em PBS, pH 7,2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Finda a etapa de fixação, todas as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Seguiu-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora a temperatura ambiente, na ausência de luz. Em seguida as amostras foram mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente submetidas ao processo de desidratação. A desidratação das amostras foi realizada com álcool etílico, a 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, seguindo-se a montagem em suportes de alumínio e posterior metalização. Assim preparadas, as amostras foram analisadas e fotografadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL LV 5600, operando a 20KV.

Determinação de Proteínas Totais - Amostras de micélio de *Trichoderma harzianum*, coletadas nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo, foram coletadas e lavadas em tampão salina fosfato, pH 7,2, por três vezes para retirada de resíduos. Amostras de 10 mg de micélio foram liofilizadas e submetidas ao processo de extração com uso do tampão uréia/ácido tricloroacético. Inicialmente, as amostras foram incubadas em 0.5 ml de ácido tricloroacético a 10%, durante cinco minutos, a temperatura ambiente, lavadas três vezes com acetona 90%, e deixadas a secar ao ar. Posteriormente, as amostras foram incubadas em 0,2 mL de tampão contendo 1% de SDS, 9 M de uréia, 25 mM de Tris-HCl pH 6.8, 1 mM de EDTA e 0.7 M de mercaptoetanol. A amostra foi mantida sob agitação, fervida por dois minutos, agitada novamente e fervida por mais um minuto. As amostras foram submetidas à quantificação através do uso do KIT LABTEST para Proteínas Totais, que se baseia no princípio de que os íons cobre em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas, formando cor púrpura, que tem absorvância a 545nm, sendo proporcional à concentração das proteínas na amostra.

RESULTADOS

Com a utilização do método descrito por JOH et al (1996), para as condições experimentais aplicadas neste estudo, foi possível detectar a presença das enzimas fosfatase alcalina e ácida, nas amostras testadas, controle e tratadas. Os resultados estão apresentados nas figuras 2A e B, respectivamente.

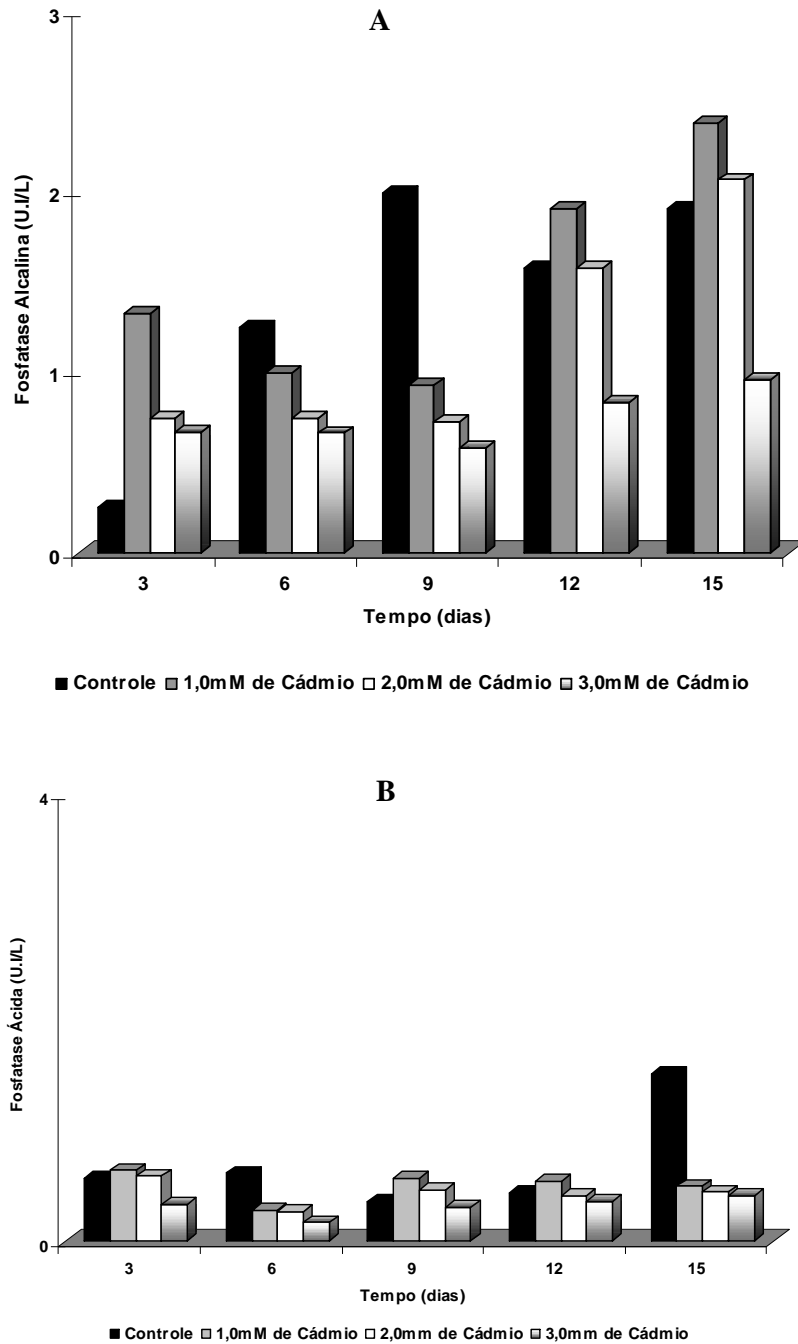


Figura 1. Comportamento da atividade das enzimas fosfatase no micélio de *Trichoderma harzianum* cultivado na presença e ausência de cádmio. A. Fosfatase alcalina. B. Fosfatase ácida.

Um aumento na atividade da fosfatase alcalina da cultura-controle foi observado nos primeiros 9 dias de cultivo, atingindo 1,99 U./L. Uma diminuição foi detectada no 12^o dia, após o que a atividade aumenta para 1,90 U./L.

Para a cultura tratada com 1mM de cádmio, uma atividade de 1,3 U.I/L foi observada no 3º dia de crescimento, após o que foi detectada uma diminuição até o 9º dia. A partir do 9º dia um aumento foi observado até o final do período de cultivo, atingindo 2,3 U.I/L, sendo 20% superior àquela da cultura-controle.

Com o tratamento com 2mM de cádmio, a atividade da enzima foi 43% menor que a observada para o tratamento com 1mM. Até o nono dia de cultivo, ocorreu diminuição da atividade. A partir do décimo segundo dia, um aumento progressivo foi observado. A atividade final correspondeu a 2,0 U.I/L.

Amostras tratadas com 3mM de cádmio apresentam comportamento semelhante, sendo a atividade menor que aquelas das culturas tratadas com 1mM e 2mM, correspondendo a diminuições de 50% e 11%, respectivamente. Contudo a atividade foi 62% maior, nos três primeiros dias de cultivo, que àquela da cultura-controle. Novamente uma diminuição foi detectada no 9º dia, após o que a atividade aumentou até o 12º dia. No 15º dia ocorreu diminuição da expressão da enzima.

Ao final do período experimental, apenas a cultura tratada com 3mM de cádmio exibiu atividade de fosfatase alcalina menor que aquela da cultura-controle.

Os resultados obtidos para a fosfatase ácida revelam, para a amostra controle, uma atividade inicial de 0,559 U.I/L, um contínuo aumento na atividade da enzima fosfatase ácida foi observado nos primeiros seis dias de cultivo, atingindo 0,610 U.I/L. No nono dia ocorre diminuição de 41,8% da atividade. A partir do 12º dia de crescimento um aumento é observado até o final do experimento, onde a atividade atinge 1,5U.I/L.

Para a amostra cultivada em presença de 1mM, foi observada uma atividade de 0,635 U.I/L no 3º dia de cultivo. Uma diminuição de 56% na atividade foi detectada no 6º dia de

cultivo. Entre o nono e o 12^o dias ocorreu aumento na expressão da enzima. A partir do 15^o dia novamente houve decaimento na atividade. Em relação ao controle, um aumento inicial de 11% na atividade foi observado nos três primeiros dias de cultivo. Ao final do experimento uma diminuição de 67% na expressão da enzima foi observada com o cultivo em 1mM de cádmio.

O tratamento da cultura com 2mM e 3mM permitiu verificar comportamento semelhante na atividade das enzimas: diminuição da atividade nos seis primeiros dias de cultivo, aumento com nove dias e diminuição até o 15^o dia para a cultura tratada com 2mM de cádmio. Em relação a cultura-controle, uma redução de 70% foi observada na atividade da enzima. Por outro lado, nas culturas tratadas com 3mM, a partir do nono dia de cultivo, ocorreu progressivo aumento da atividade até o final do experimento. Contudo, em relação ao controle, uma redução de 72% foi observada.

O tratamento com cádmio, nas concentrações de 1mM e 2mM, gerou atividades da fosfatase ácida, durante os três primeiros dias de cultivo maiores que aquela observada para a cultura-controle.

O comportamento da morfologia das hifas, controle e tratadas com cádmio, foi avaliado através da microscopia óptica. A análise das imagens obtidas permitiu verificar o surgimento de variações morfológicas nas hifas de *Trichoderma harzianum* submetidos ao cultivo em meio Sabouraud-controle e contendo diferentes concentrações de cádmio. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 2A-D.

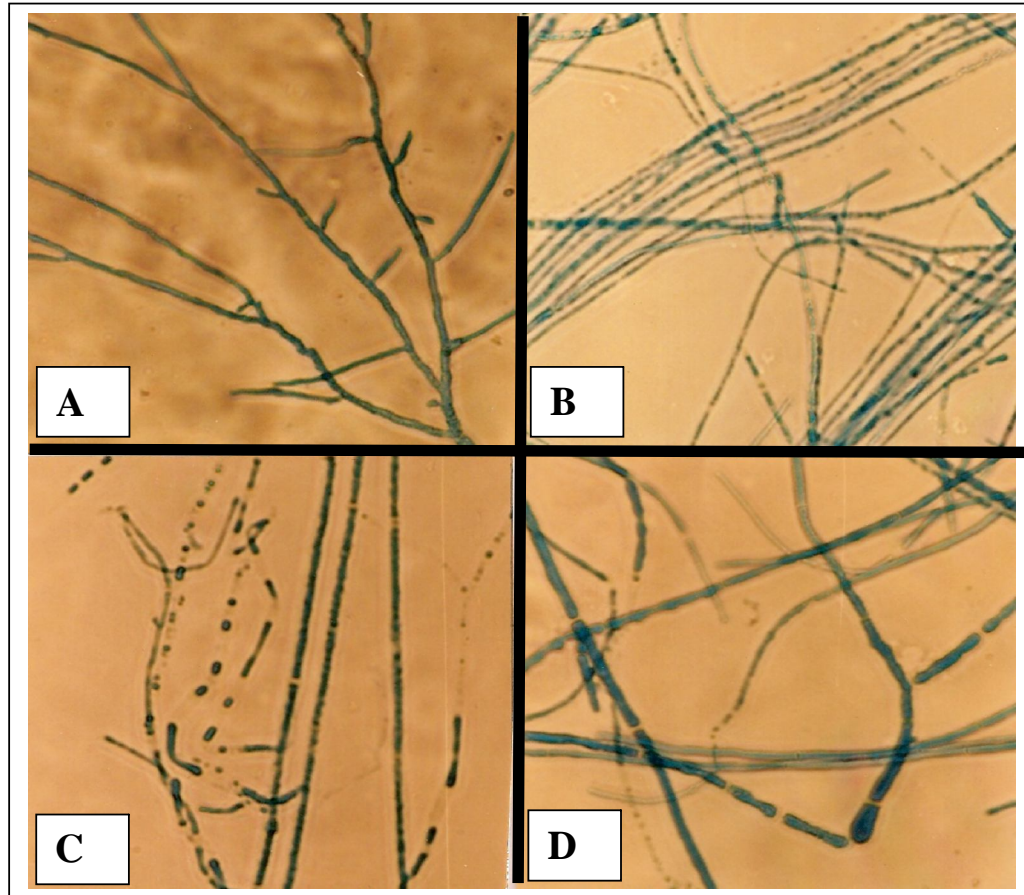


Figura 2. Microscopia Óptica de amostras de *Trichoderma harzianum*. A. Cultura controle; B. Cultura tratada com 1mM de cádmio; C. Cultura tratada com 2mM de cádmio e D. Cultura tratada com 3mM de cádmio. 400X.

Na cultura-controle, nota-se a presença de hifas septadas, com parede delgada, hialinas. Notar citoplasma homoganeamente corado e denso (Figura 2A).

Por outro lado, aquelas tratadas com cádmio exibiram menor expansão radial, proporcional à concentração do metal no meio. O cultivo em presença de cádmio também induziu o surgimento de intensa septação e ramificação nas hifas. Quanto maior a concentração de cádmio, maior a ramificação/septação das hifas.

Paralelamente, percebe-se que o citoplasma das hifas cultivadas em presença de cádmio apresenta-se heterogêneo e com aspecto granular. Quanto maior a concentração do metal no meio de cultivo, mais intensa é a granulação citoplasmática, figuras 2B, 2C e 2D, 1mM, 2mM e 3mM de cádmio, respectivamente.

O estudo ultraestrutural permitiu verificar o surgimento de variações na estrutura fina do organismo submetido ao cultivo em presença de cádmio. O estudo do comportamento ultraestrutural foi realizado com amostras cultivadas em meio Sabouraud, com e sem cádmio, com 3 e 15 dias de cultivo. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 3A–F.

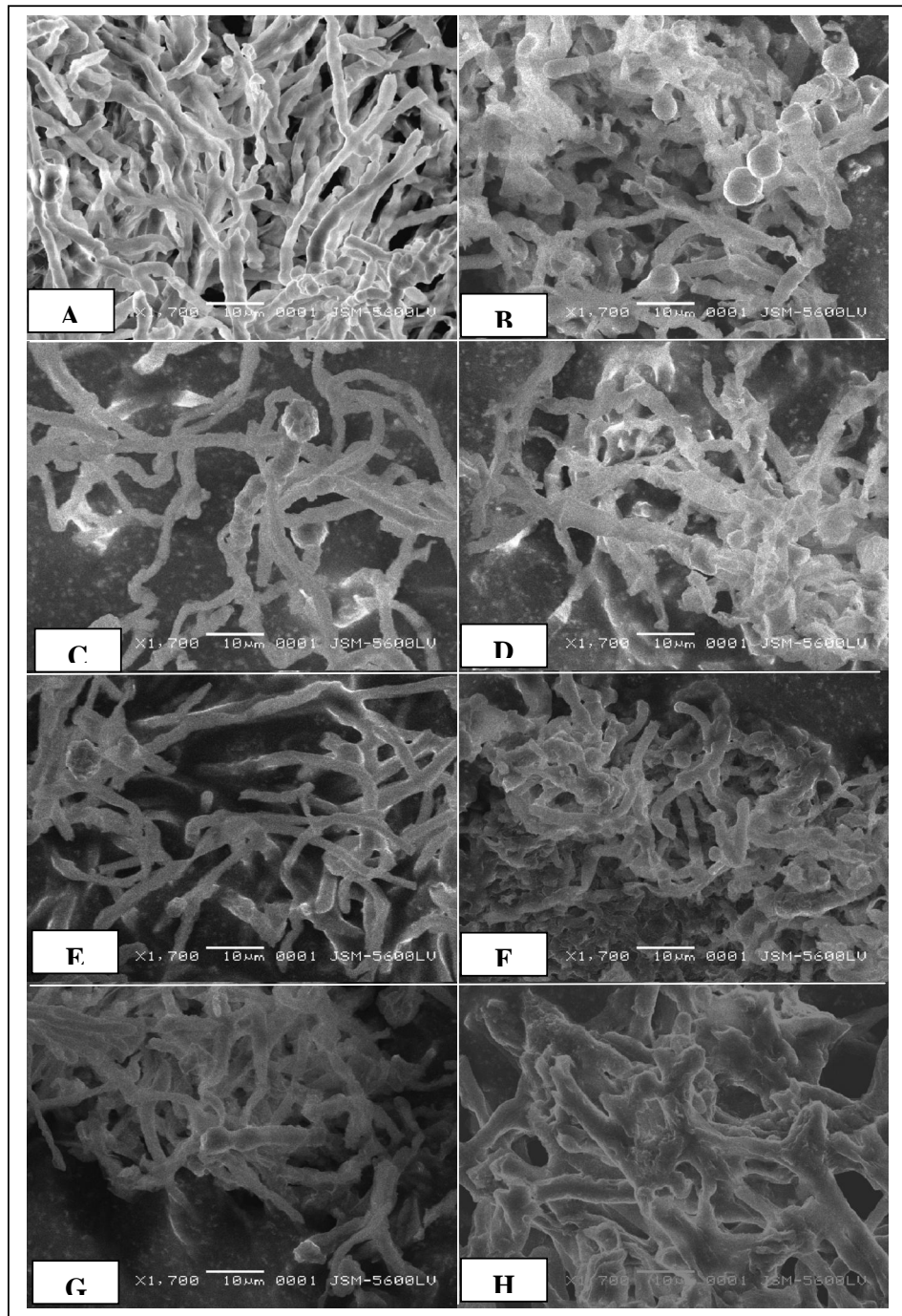


Figura 3. Eletromicrografias de *Trichoderma harzianum*. A. Amostra Controle 3 dias; B. Amostra Controle 15 dias; C. Amostra cultivada em 1mM de cádmio 3 dias; D. Amostra cultivada em 1mM de cádmio 15 dias; E. Amostra cultivada em 2mM de cádmio 3 dias; F. Amostra cultivada em 2mM de cádmio 15 dias; G. Amostra cultivada em 3mM de cádmio 3

dias; H. Amostra cultivada em 3mM de cádmio 15 dias. 1.700X.

Para as amostras-controle com 3 dias de cultivo verificou-se a presença de micélio abundante, homogêneo, com hifas alongadas, septadas, em forma de bastão (figura 3A). Para amostras com 15 dias de cultivo, inúmeras estruturas de reprodução foram observadas. O micélio exibiu baixa eletrondensidade (figura 3B).

Por outro lado, amostras tratadas com 1mM de cádmio, 3 dias exibiram micélio mais escasso, retorcido, intensa ramificação, aumento de eletrondensidade; hifas encurtadas foram também visualizadas (figuras 3C-D).

Estrutura fina semelhante foi observada para as amostras tratadas com 2mM de cádmio. Contudo, maior eletrondensidade, padrão de ramificação e encurtamento das hifas foram observados em relação às amostras tratadas com 1mM (figuras 3E-F).

Para as amostras cultivadas em presença de 3 mM, figuras 3G e 3H, a intensidade das alterações citadas foi maior. Adicionalmente, hifas com 15 dias cultivo apresentaram-se mais retorcidas e espessas que aquelas tratadas com 1mM e 2mm de cádmio. Notou-se uma intensa alteração no padrão de ramificação das hifas.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que a presença de cádmio no meio de cultivo induz o surgimento de variações na estrutura fina do isolado testado. Uma visível diminuição de clamidosporos e na quantidade de hifas. Adicionalmente, a eletrondensidade da hifa e seu padrão de ramificação foram intensamente modificados quando do cultivo na presença do metal. Paralelamente, as alterações observadas foram diretamente associadas à concentração do metal.

Os dados obtidos na análise do perfil de proteínas totais das amostras-controle e tratadas com 1mM, 2mM e 3mM de cádmio estão apresentados na Figura 4. Verificou-se

que o tratamento com cádmio nas diferentes concentrações induziu o surgimento de um perfil de proteínas totais distinto para as amostras avaliadas.

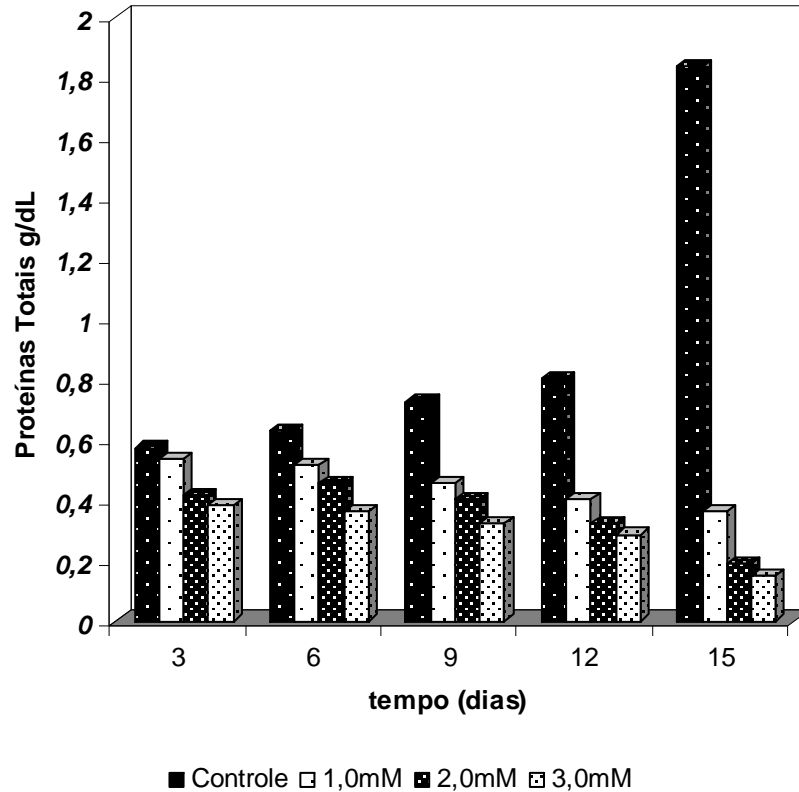


Figura 4. Conteúdo de Proteínas Totais de *Trichoderma harzianum* cultivado na ausência e na presença de cádmio.

A análise da figura permite verificar que o tratamento com cádmio, nas diferentes concentrações, induziu o surgimento de um perfil de proteínas totais distinto para as amostras avaliadas em relação à cultura-controle.

O conteúdo total de proteínas solúveis da amostra-controle aumentou com o tempo de cultivo, atingindo um total de 1,837 g/dL no período final do experimento. Em relação às culturas tratadas, para todas as concentrações de cádmio foi observada uma diminuição na concentração de proteínas celulares.

Tal variação dependeu da concentração utilizada. Conteúdos de 0,363 g/dL, 0,191 g/dL e 0,150 g/dL foram obtidas para as concentrações de 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente. Reduções de 80%, 89% e 91% nos conteúdos de proteínas totais foram determinadas para 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente, em relação à cultura-controle.

DISCUSSÃO

A biorremediação de resíduos industriais contendo metais pesados tem sido demonstrada por inúmeras companhias de biotecnologia empregando o processo de bioacumulação. Ao mesmo tempo, a biossorção, a bioprecipitação e a internalização por microrganismos presumem a possibilidade de uma alternativa para os métodos químicos e físicos convencionais da remediação de metais. Várias espécies de microrganismos, como bactérias, algas e fungos, têm sido relatadas como eficientes acumuladores de diferentes tipos de metais pesados. Células íntegras, imobilizadas, vivas ou mortas, e seus produtos atuam como sistemas de bioacumulação eficientes das formas solúvel e particulada de íons metálicos. Dessa forma, o entendimento das respostas fisiológicas e bioquímicas de microrganismos frente à presença de metais pesados é essencial em função de seu potencial uso em ambientes poluídos/contaminados (8, 21).

Como se observou cádmio é um íon metálico divalente, que exibe potente toxicidade para muitos tipos celulares e organismo (27, 11). Em humanos, o principal efeito tóxico do metal está associado a lesões renais, via rearranjo do citoesqueleto de actina, perda de barreiras epiteliais, lesões vasculares, defeitos na espermatogênese, e sobre canais de cálcio (3, 4, 20, 32).

Dentre os microrganismos, os fungos mostram vantagens por exibirem material de parede celular com excelentes propriedades de ligação para metais. Contudo, os mecanismos

de ligação de metais não é bem entendido devido à complexa natureza da biomassa celular. Dessa forma, a literatura revela um grande número de espécies de fungos com excelente potencial para bioissorção de metais (9, 17, 27, 35, 37, 38, 39, 40).

A tolerância/resistência de *Trichoderma harzianum* frente diferentes concentrações de cádmio foi avaliada, neste estudo, através da atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina, aspectos morfológicos/estruturais e proteínas totais.

O processo de crescimento celular resulta da modificação química e estrutural na organização celular, as quais funcionam como marcadores para os diferentes estágios de maturação. Os fungos são extremamente versáteis em suas respostas às variações nas condições ambientais. Condições físicas e químicas do ambiente, como temperatura, pH, aeração, radiação, fontes de nutrientes, entre outras, geram respostas metabólicas e fisiológicas distintas, como forma de adaptação ao meio ambiente e, portanto dizem respeito à sobrevivência celular (1).

Outrossim, a toxicidade do cádmio, bem como a habilidade de tolerar a presença do íon, foi avaliada em função da atividade das fosfatases ácida e alcalina, enzimas associadas à habilidade de sobrevivência em presença de agentes estressores.

Os microrganismos como decompositores são fundamentais para os ciclos biogeoquímicos. Dessa forma, a atividade celular microbiana é essencial para a manutenção das cadeias biológicas. Como resultado da atividade microbiológica, ressalta-se a excreção de enzimas nos solos e sedimentos, sendo responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e estão envolvidas no suprimento/ciclagem de nutrientes. A atividade enzimática nos solos é sensível a poluição por metais pesados e pode ser utilizada como ferramenta para monitorar modificações ambientais induzidas pelas atividades antropogênicas (12).

Alguns estudos demonstram os efeitos da contaminação de solos com metais pesados sobre a atividade de enzimas microbianas extracelulares. O principal efeito é a diminuição da atividade de enzimas como desidrogenases, urease, fosfatase alcalina e fosfatase ácida. Contudo, tal diminuição está diretamente associada a granulometria do solo. Paralelamente, a inibição das atividades enzimáticas de microrganismos frente à presença de metais pesados possivelmente está relacionada aos efeitos sobre as membranas celulares (21, 30, 46).

Os resultados demonstram que as culturas, controle e tratadas, exibem atividade significativa para a fosfatase alcalina em relação à fosfatase ácida. Contudo, o tratamento, com as diferentes concentrações de cádmio, induziu variações nos perfis de atividade enzimática. O tratamento induziu o surgimento de uma maior atividade na expressão da fosfatase alcalina nos três primeiros dias de cultivo, e que as culturas tratadas com 1mM e 2mM exibiram maior atividade que a cultura-controle no final do período experimental, demonstrando o efeito positivo do metal na expressão enzimática. Os resultados apresentados são os primeiros relacionando os efeitos do cultivo em presença de cádmio com a atividade das fosfatases ácida e alcalina em *Trichoderma harzianum*.

Alterações morfológicas, bem como variações no padrão de crescimento celular de eucariotos e procariotos, são citadas como efeitos induzidos pelo contato com cádmio. A intensidade das respostas está, via de regra, associada ao tempo de contato e a concentração do metal. Tais modificações possivelmente estão relacionadas a alterações na estrutura/permeabilidade da membrana citoplasmática, produzindo progressiva alteração de forma e perda de atividade metabólica (6, 8, 14, 18, 20, 24, 29, 41, 42)

Considerando tais relatos, neste estudo, a toxicidade do cádmio foi também avaliada em função das alterações na morfologia celular de *Trichoderma harzianum*. Variações no

padrão de ramificação, bem como na densidade e homogeneidade citoplasmática foram observadas nas hifas de culturas submetidas ao cultivo em presença do metal. Novamente, a intensidade das alterações está diretamente associada à concentração do íon metálico.

Embora poucos sejam os estudos com fungos, dados sobre o comportamento da morfologia celular em função da presença de metais pesados são relatados; como exemplo, a presença de cobre em meio de cultura induziu alterações morfológicas em *Mucor rouxii*. A ligação do metal via mecanismo passivo, permite a observação do surgimento de grupos químicos funcionais na superfície celular, o que conduz a uma alta habilidade de ligação e conseqüentemente a variações na morfologia celular, gerando micélios altamente ramificados e encurtados.

Ghariab (2004) revela que a extensão das colônias e o peso seco micelial de isolados de *Fusarium* e *Alternaria* são significativamente inibidos pela presença de cádmio. Adicionalmente, foi observado que o metal alterou a morfogênese, gerando micélios com profusa ramificação, curtos e uma intensa formação de cadeias de conídios em relação às culturas controle.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram padrão semelhante de alterações no micélio de *Trichoderma harzianum*.

A utilização da microscopia eletrônica de varredura tornou possível a análise de aspectos da estrutura fina de fungos, o que ocasionou a geração de informações adicionais, as quais associadas à bioquímica, à genética e à fisiologia introduziram novas perspectivas quanto ao funcionamento da célula fúngica (1).

Considerando que a acumulação de metais pesados se dá através de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, a presente proposta avaliou o comportamento da estrutura fina de *Trichoderma harzianum*, submetido ao crescimento em

presença de cádmio, através da microscopia eletrônica de varredura.

Houve diferenças associadas ao padrão de formação de clamidosporos, forma da hifa, e eletrondensidade entre amostras cultivadas na presença e ausência do cádmio. Estes são os primeiros relatos associados aos efeitos do cádmio sobre a ultraestrutura de *Trichoderma harzianum* cultivado em presença de cádmio.

Para determinar a localização, bem como a distribuição subcelular de metais pesados adsorvidos/internalizados, e a influência de sua presença na morfologia e estrutura celular fina, ensaios são realizados com base na utilização da microscopia óptica e eletrônica têm sido relatados (27).

Os dados apresentados neste trabalho revelam pela primeira vez a influência do cádmio sobre a morfologia e ultraestrutura de *Trichoderma harzianum*, e os dados obtidos revelam que o cádmio induziu o surgimento de variações, relacionadas a concentração utilizada no meio de cultivo, corroborando os dados da literatura para outras espécies de fungos.

O crescimento em presença de metais pesados influencia o comportamento bioquímico de microrganismos. Dessa forma, foi avaliado o comportamento do perfil de proteínas totais de *Trichoderma harzianum*. Os resultados demonstraram variação na síntese de proteínas em função da presença do metal, bem como na concentração utilizada.

Hasan (2007) demonstrou que zinco e magnésio na concentração de 0,5 mM/l e 0,1 mM de cádmio induziram aumento no conteúdo de proteínas em *Fusarium oxysporum*. O autor atribui tal fato à estimulação de enzimas como nitrato redutase, malato desidrogenase e fosfatase ácida. Por outro lado, na concentração de 1mM, os metais induziram redução nos conteúdos de aminoácidos e proteínas nos micélios. Tal resultado se deve ao efeito tóxico do metal sobre as reações responsáveis pela biossíntese de proteínas.

Tsekova et al. (2000) determinaram os efeitos tóxicos do cádmio em *Aspergillus niger* sobre a duplicação do ADN, bem como sobre a síntese de proteínas. Ao mesmo tempo, os autores demonstraram os efeitos do cádmio sobre o aumento da produção de lipídeos e polissacarídeos pelo fungo.

Os resultados apresentados são fundamentais para a geração de conhecimentos acerca das respostas celulares frente a presença de cádmio, sendo importantes para estudos dos mecanismos envolvidos na remediação biológica de metais pesados.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. Alexopoulos, C.J; Mims, C.W; Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. New York, John Wiley e Sons publishers, 356p.
2. Babich H, Stotzky G. (1978). Effects of cadmium on the biota: influence of environmental factors. *Adv. Appl. Microbiol.*, 23, 55-117.
3. Barrouillet, M. P., Moiret, A., Cambar, J. (1999a). Protective effect of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture. *Arch. Toxicol.* 73, 485-488.

4. Barrouillet, M. P., Potier, M., Cambar, J. (1999b). Cadmium nephrotoxicity assessed in isolated rat glomeruli and cultured mesangial cells: evidence for contraction of glomerular cells. *Exp. Nephrol.* 7, 251-258.
5. Beyersmann, D. (2002). Effects of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicol. Lett.* 127, 63-68.
6. Bruins, M. R., Kapil, S., Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Sa.*, 45, 198–207.
7. Deckert, J. (2005). Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals*, 18(5), 475-81
8. Gadd, G. M., White, C. (1989). *Heavy metal e radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeasts. In Metal±Microbe Interactions*, pp. 19±38. Edited by R. K. Poole e G. M. Gadd. Oxford: IRL Press.
9. Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25-60.
10. Gavrilesca M. (2004). Removal of heavy metals from the environmental by biosorption. *Eng. Life Sci.* 4, 219–32.
11. Gharieb, M. M, Gadd, G. M. (2004). Role of glutathione in detoxification of metal (loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMetals*, 17, 183–8.

12. Gianfreda, L.; Bollag, J. M. (1996). Influence of natural and antropogenic factors on enzyme activity in soil. In: Stotzky, G.; Bollag, J.M. *Soil Biochem.* 9, 123-193.
13. Goering, P. L., Waalkes, M. P., Klaassen, C. D. (1995). Toxicology of cadmium. In *Hebook of Experimental Pharmacology*, vol. 115. Toxicology of Metals - Biochemical Aspects (R. A. Goyer, e M. G. Cherian, Eds.), pp. 189-214. Springer-Verlag, Berlin.
14. Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1-11.
15. Hasan, H.A.H. (2007). Role of rock phosphate in alleviation of heavy metals stress on *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil Environ.* 53 (1), 1–6
16. Järup, L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dialysis Transp.* 17, 35-39.
17. Jentschke, G., Goldbold, D. L.. (2000). Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol. Plant*, 109, 107–116.
18. Joh, T., Malick, D. H., Yazaki, J., Hayakawa, T. (1996). Purification and characterization of secreted acid phosphatase under phosphate-deficient condition in *Pholiota nameko*. *Mycoscience*, 37, 65–70.
19. Kratochvil, D, Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals.

- Trends Biotechnol.* 16(7), 291–300.
20. Kumar, G. P, Prasad, M. N. (2004). Cadmium toxicity to *Ceratophyllum demersum* L.: morphological symptoms, membrane damage, and ion leakage. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72(5), 1038-45.
 21. Kuperman, R. G., Carreiro, M .M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassle ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* .29, p.179-190.
 22. Kuroda, K, Ueda, M, Shibasaki, S, Tanaka, A. (2002). Cell surface-engineered yeast with ability to bind, and self-aggregate in response to copper ion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 259–64.
 23. L'Azou, B., Dubus, I., Ohayon-Courtès, C., Labouyrie, J. P., Perez, L., Pouvreau, C., Juvet, L., Cambar, J. (2002). Cadmium induces direct morphological changes in mesangial cell culture. *Toxicology*, 179, 233-245.
 24. Leyval, C., Turnau, K., Haselweter, K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 139-153.
 25. Lín, E, Vazquez, C. (2003). Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*, 50, 137–43.

26. Lovley, D. R, Coatest, J. D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 285–9.
27. Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Intl.* 30, 261–278.
28. Martelli, A, Rousselet, E, Dycke, C, Bouron, A, Moulis, J. M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie.* 88(11), 1807-14
29. Mehra, R. K., Winge, D. R. (1991). Metal-ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *J. Cell. Biochem.* 45:30–40.
30. Moreno, J. L., García, C., Lei, L., Falchini, L., Pietramellara, G., Nannipieri, P. (2001). The ecological dose value (ED₅₀) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biol. Biochem.* 33, 483-489.
31. Moreno, J. L., García, C., Hernández, T. (2003). Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *Eur. J. Soil Sc.* .54, 377-386,
32. Nordberg, G. F., Herber, R. F. M., Alessio, L. (Eds.) (1992). *Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 345p.

33. Poner, E. J., Briones, R., Leyval, C. (2000). Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant e Soil*, 226, 227–234
34. Ros, R, Cooke, D. T, Martinez-Cortina, C, Picazo, I. (1992). Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and protonpumping of rice (*Oryza sativa*, L.) shoots. *J. Exp. Bot*, 43, 1475-81.
35. Rosen, B. P. (2002). Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp. Biochem. Physiol.* Part A. *Mol. Integr. Physiol.* 133, 689–93.
36. Satoh, M, Koyama, H, Kaji, T, Kito, H, Tohyama, C. (2002). Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med*, 196(1), 23-32
37. Takahashi, Y., Poteser, M., Masui, H., Koizumi, N., Wakabayashi, I. (2004). Effects of cadmium in vitro on contractile and relaxant responses of isolated rat aortas. *Environ. Health Prev. Med.* 9, 251–256.

38. Tsekova, K., Dentchev, D., Todorova, D. (2000). Effect of cadmium and copper on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol*, 45:331–334
39. Uetani, M, Kobayashi, E, Suwazono, Y, Kido, T, Nogawa, K. (2006). Cadmium exposure aggravates mortality more in women than in men. *Int J Environ Health Res*, 16, 273-279.
40. Volesky, B. (1994). Advances in biosorption of metals-selection of biomass types. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 291–302.
41. Waalkes, M. P., Coogan, T. P., Barter, R. A. (1992). Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 175-201.
42. Wang, J. L., Han, Y. J., Qian, Y. (2000). Progress in metal biosorption by microorganisms. *Microbiology*, 27, 449–52.
43. Wang, J. L. (2005). Microbial cell-surface display and the application in bioremediation of contaminated environment. *Chin. Biotechnol.* 25, 112–7.
44. Wang, J., Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotech. Adv*, 24, 427–451
45. Wang, Z., Templeton, D. M. (1996). Cellular factors mediate cadmium-dependent actin depolymerization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 115-121.

46. Wyszowska, J., Kucharski, J., Lajszner, W. (2006). The effects of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals. *Polish J. Environm. Studies*, 15, 927-934.

47. Zalizniak, L, Nugogoda D. (2006). Cadmium Toxicity to *Daphnia carinata*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 77, 748-754.

CAPÍTULO 3

Trabalho a ser submetido à Revista *Biotechnology Resource*

Comportamento do Polifosfato e Remoção de Cádmio por *Trichoderma harzianum*

Adriana de Lima Freitas¹, Marcos Antônio Barbosa de Lima², Patrícia Mendes de Souza³,

Gabrielle Ferreira de Moura⁴, Aline Elesbão do Nascimento^{5*},

1.Mestranda Programa Desenvolvimento de Processos Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Recife – PE,;

2. Faculdades Integradas de Patos- FIP Paraíba;

3.Doutora Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco;

4.Graduanda Faculdade Maurício de Nassau – PE;

5.Universidade Católica de Pernambuco - Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais.

*Autor para correspondência: Rua Nunes Machado, 42, Boa Vista, Bloco J. Recife - PE.
CEP: 50.050-590/FAX: 081- 2119 4043.

Resumo

Metais pesados ameaçam o meio ambiente e os sistemas vivos porque são extremamente tóxicos em concentrações, traço e, diferentemente dos agentes poluidores orgânicos, não são biodegradáveis. Os microrganismos normalmente estão sujeitos a estresse em seu ambiente, como variações na temperatura, no pH, na disponibilidade de nutrientes, e pela presença de metais pesados, que afetam seu estado metabólico. Um dos mecanismos propostos para a tolerância a metais é o seqüestro dos íons com longos polímeros de polifosfato inorgânico. O presente estudo diz respeito ao metabolismo do polifosfato em *Trichoderma harzianum*, agente de biocontrole e com inata resistência contra a maioria dos produtos químicos utilizados na agricultura, incluindo metais, cultivado em presença de diferentes concentrações de cádmio. Os resultados relativos à produção de biomassa revelaram diminuição diretamente associada à concentração do metal no meio de cultivo. Culturas-controle foram capazes de acumular polifosfato nas condições utilizadas. Por outro lado, o estresse induzido pelo cádmio revelou a diminuição no conteúdo do polifosfato relacionado à concentração utilizada durante

o crescimento do microrganismo.. A eficiência de remoção de cádmio foi avaliada, revelou o potencial do organismo frente a altas concentrações do metal. Os dados indicam o potencial de acumulação de polifosfato pelo fungo, bem como sua degradação relacionada à sobrevivência na presença de íons cádmio e sua habilidade no processo de remediação.

Palavras chave: Polifosfato; *Trichoderma harzianum*; Cádmio.

Abstract

Heavy metals endanger the environment e biological systems because they are extremely toxic at trace concentrations e unlike organic pollutants, they are not biodegradable.. Microorganisms are normally subjected to stress in their environment, such as temperature e pH changes, nutrient starvation e the presence of toxic heavy metals, which affect their physiological state. One of the proposed mechanisms for metal tolerance is the sequestration of metal cations with long polymers of inorganic polyphosphate. This study is concerned with polyphosphate metabolism in *Trichoderma harzianum*, biocontrol agent, e which exhibit an innate resistance against chemical agents used in agriculture, including heavy metals grown in different cadmium concentrations. Results related to biomass production revealed reduction associated to heavy metal concentrations in culture medium. Control cultures were able to accumulate polyphosphate in the conditions used. On the other he, the Cadmium stress induced the expenditure of polyphosphate related to metal concentrations during cellular growth. The cadmium removal was determined e revealed the potential of the organism related to high metal concentrations. The results pointed out the accumulation potential of polyphosphate by the fungus, as well as its degradation related to survival in cadmium ions presence e its ability in the remediation process.

Key Words: Polyphosphate; *Trichoderma harzianum*; Cadmium.

1. Introdução

O estudo das interações entre metais pesados e microrganismos tem sido focado nos mecanismos de transformação e conversão de íons metálicos pela redução em diferentes ambientes poluídos, na seleção e no uso de organismos resistentes como indicadores da toxicidade para outras formas de vida, bem como na análise de mecanismos, determinantes e transferência de resistência. Dessa forma, ensaios relacionados ao comportamento bioquímico e fisiológico são ferramentas fundamentais para a elucidação de tais fenômenos (Kapoor e Viraraghavan 1995; Gardea-Torresdey et al., 1997; Levyal et al., 1997).

As respostas fisiológicas dos microrganismos como viabilidade, metabolismo, estágios de crescimento e morte são induzidas por inúmeros processos de ordem natural e/ou antropogênica. Dessa forma, como resultado das pressões ambientais, os microrganismos desenvolveram, rapidamente, mecanismos de adaptação/resistência para lidar com as adversidades. Assim, estudos associados à avaliação das respostas celulares são fundamentais para acessar a heterogeneidade populacional, a qualidade ambiental, a ecologia microbiana com vistas ao entendimento da poluição por xenobióticos e para a relevância do potencial no processo de detoxificação/remediação (Gadd, 1993; Hall, 2002; Rosen, 2002; Nies, 1999).

O cádmio é reconhecido pela sua toxicidade através da cadeia alimentar, sendo um dos componentes tóxicos dos resíduos industriais e municipais. O metal não tem função biológica essencial e exibe efeitos mutagênicos, carcinogênicos, fitotóxicos, ecotóxicos, sendo extremamente tóxico, em função de sua concentração, para todos os sistemas vivos, especialmente, para os mamíferos, incluindo o ser humano. Os efeitos tóxicos do metal se devem a sua habilidade de inativar enzimas contendo grupos sulfidril e podem inibir a fosforilação oxidativa. Adicionalmente, pode competir com outros metais como zinco e selênio pela inclusão nas metalo-enzimas e compete com o cálcio por sítios de ligação em

proteínas reguladoras como a calmodulina. Essas propriedades, juntamente com seu uso nas baterias, fazem do cádmio um dos mais comuns poluentes ambientais (Beyersmann 1994; Roane e Pepper, 2000; Bhattacharyya et al., 2000; 2001; Kumar e Prasad, 2004; Deckert, 2005; Jarup, 2002; Waisberg et al., 2003).

Os mecanismos de resistência de microrganismos frente à presença de metais podem ser classificados de duas formas: metal dependente e metal-independente (Gomes et al., 1998; Kratochvil e Volesky, 1998; Gadd, 2000; Gravilesca. 2004; Vijver et al., 2004). Um dos mecanismos é o seqüestro dos íons metálicos via polifosfato (Kornberg et a 1999). Paralelamente, propõe-se a existência de dois mecanismos para a resistência associada ao polifosfato: redução da concentração intracelular do metal pela ligação e/ou pela hidrólise do polímero, que detoxifica o metal (Aiking et al., 1984; Torres et al., 1998; Keasling et al., 1999; Kornberg et al., 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de *Trichoderma harzianum*, cultivado na presença de diferentes concentrações de cádmio, em relação ao crescimento, perfil de polifosfato e a habilidade de remoção do íon metálico, considerando a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência/tolerância contra metais pesados, que indicaria uma aplicação de organismos acumuladores de polifosfatos para a biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados.

2. Métodos

2.1. Microrganismo e Condições de Cultivo

O isolado de *Trichoderma harzianum* foi obtido do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco. O isolado foi mantido em Batata Dextrose Agar (BDA) a 5⁰ C. O fungo foi repicado em meio Sabouraud dextrose agar para a produção de esporos e incubado a 28°C por 6 dias, gereo um pré-inóculo.

2.2. Crescimento em Diferentes Meios de Cultivo

Pré-inóculos correspondentes a discos de cultura, com um centímetro de diâmetro, foram inoculados em placas de Petri, contendo os meios Extrato de Malte, Batata Dextrose Agar, Sabouraud Dextrose Agar e Yeast Malt Agar, contendo cloreto de cádmio, preparado em água destilada e deionizada, pH 6,0, calibrada com o uso de hidróxido de sódio 1N e de ácido acético a 10%, nas concentrações de 1mM, 2mM e 3mM. As culturas foram incubadas a 28°C, durante 7 dias. Amostras-controle foram crescidas nos meios citados sem o metal. O crescimento foi avaliado através do crescimento radial, medido pelo diâmetro dos halos, em milímetros, a cada vinte e quatro horas de incubação. Os resultados são expressos como média aritmética de triplicatas.

2.3. Curva de Crescimento

Frascos de Erlenmeyer de 300 mL de capacidade, contendo 150 mL de meio Sabouraud líquido foram inoculadas e incubadas a 28°C sob agitação orbital de 250 Hertz, durante quinze dias. Amostras foram coletadas com 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo e submetidas à liofilização para determinação da produção de biomassa por peso seco. Amostras-controle foram crescidas nos meios citados sem cádmio. Todos os resultados foram expressos como média de cinco réplicas.

2.4. Consumo de Glicose

A glicose foi dosada através do método enzimático-colorimétrico (Lab-Test), que se fundamenta na oxidação enzimática da glicose, presente nas amostras, pela enzima glicose oxidase. Após a reação é formado um cromógeno vermelho-cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose, que pode ser determinada por leitura da absorbância a 510 nm. Foi elaborada uma curva padrão utilizando solução de glicose (0,5 – 5,0 g/mL) (Henry et al., 1974). Amostras correspondentes aos sobrenadantes de culturas cultivadas em meio

Sabouraud, controle e tratadas. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital (Spectronic Mod. Genesys 2).

2.5. Extração e Dosagem de Polifosfato Total

O polifosfato intracelular total foi extraído e dosado segundo o método descrito por Mcgrath e Quinn (2000). Amostras de 7mg de micélio (peso seco), obtidas no meio de incubação, durante os intervalos de cultivo do fungo, nas amostras controle e tratadas foram coletadas e lavadas duas vezes em solução de NaCl 1,5M contendo EDTA 0,01M e NaF 1mM. Em seguida, foram colocadas na solução de lavagem e sonicadas, em gelo, por 12 períodos de 2 minutos com intervalos de 1 minutos em 16 KHz. O extrato resultante foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4°C para remover os fragmentos celulares. Para determinar o conteúdo do polifosfato celular total, 100µl de HCl concentrado foi adicionado a 0,5 ml do extrato celular e aquecido a 100° C por 45 minutos. O fosfato liberado foi dosado utilizando-se o método colorimétrico (Fiske-Subbarow, 1925), que se baseia na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, resultando em um complexo fosfomolibdato de cor azul, quantificado espectrofotometricamente a 600 nm, e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do fósforo. Uma curva padrão foi elaborada, utilizando-se uma solução de fósforo (0,5 – 5,0 mg/dL). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, Spectronic, modelo Genesys 2. A concentração do polifosfato foi expressa em miligramas de fósforo por decilitro e dadas como média de triplicatas. Uma amostra não hidrolisada foi utilizada como um controle para determinar o nível de fosfato livre da célula. O polifosfato total é expresso em miligramas por grama de biomassa.

2.6. Cinética de remoção do cádmio

Para avaliar a cinética de remoção de cádmio pelo micélio de *Trichoderma harzianum*, amostras de sobrenadantes de culturas coletadas nos intervalos de 3 e 15 dias foram utilizadas. A concentração do metal foi determinada por espectroscopia de plasma, com lâmpada específica para o cádmio. Uma curva padrão foi elaborada. Experimentos foram conduzidos em triplicata e as médias foram usadas nos dados. A eficiência de remoção do metal - q (mg do íon metálico/grama de biomassa) foi calculada useo-se a seguinte equação:

$$q = (C_0 - C_f)/m$$

Onde C_0 e C_f corresponderam às concentrações inicial e final do metal (mg/L), respectivamente, e m é a biomassa em peso seco (g).

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeitos do cádmio no crescimento de *Trichoderma harzianum*

A aplicação de biomateriais para a remoção de metais tem atraído à atenção de vários pesquisadores. Microrganismos, normalmente, estão sujeitos a situações de estresse em seu ambiente, como temperatura, pH, nutrientes, mudanças e presença de agentes xenobióticos, que afetam seu estado fisiológico. Bactérias, fungos e algas, bem como produtos derivados desses organismos, têm potencial para remover inúmeras substâncias químicas (Davis et al., 2003; Malik, 2004; Kadukova e Vircikova, 2005).

A remoção de metais pesados, ou sua estabilização, são os primeiros passos para a detoxificação de ambientes contaminados. Assim, a remediação de ambientes contaminados com metais pesados é um problema complexo e vem atraindo a atenção de inúmeros pesquisadores e indústrias. Métodos físico-químicos convencionais para remover metais pesados de inúmeros ambientes incluem redução química, tratamento eletro-químico, troca

iônica, precipitação e recuperação por evaporação. Contudo, tais processos exibem significativas desvantagens, como incompleta remoção, altas necessidades de energia e reagentes, além de geração de outros produtos tóxicos e são geralmente muito onerosos (Sağ, Kutsal, 1995; Atlas e Unterman, 1999; Liu et al. 2001).

A indústria é responsável pela produção de diferentes substâncias poluentes encontradas na natureza. Dentre os principais poluentes, os metais pesados e seus derivados exercem papel preponderante, os quais são diretamente prejudiciais à saúde humana e cujas substâncias orgânicas comprometem a manutenção dos processos vitais. As principais fontes de poluição são as minas e as indústrias de carvão, gás natural, papel, têxtil e petrolífera (Volesky et al., 1993).

Entre os processos utilizados pelos microrganismos para a detoxificação de metais podem ser citados: precipitação como fosfatos, carbonatos e sulfetos, volatilização por grupos metila, exclusão física por componentes eletronegativos nas membranas e substância poliméricas extracelulares, sistemas de efluxo dependentes de energia e seqüestro intracelular por proteínas ricas em cisteína de baixo peso molecular (Hughes e Poole, 1989; Gadd, 1990; Silver e Misra, 1988). De modo geral, enquanto a resistência inclui uma variedade de estratégias para lidar com as concentrações tóxicas dos metais no ambiente (Roane et al., 1996), tais estratégias existem para evitar a entrada do metal na célula ou para ativamente bombear o metal para fora da célula (Roane e Pepper, 1997, 2000).

A diversidade genética e metabólica dos fungos tem sido explorada há muitos anos visado à obtenção de produtos industriais e biotecnológicos em resposta a condições físicas e químicas de seu ambiente (Lloyd, 2002; Fu e Viraraghavan, 2002). Adicionalmente, os fungos têm sido utilizados para o tratamento de resíduos e rejeitos industriais e urbanos. O

potencial de uso reside em seu arsenal molecular, produzido em resposta ao ambiente (Kapoor e Viraraghavan, 1995; Villen, 2003).

Os resultados obtidos na análise do crescimento de *Trichoderma harzianum* em diferentes meios de cultivo, com vistas à seleção de um meio padrão para os experimentos bioquímicos e estruturais, estão apresentados nas figuras 1A-D. Dessa forma, as Figuras 1A-D apresentam os resultados obtidos para o cultivo de *Trichoderma*, cultivado em meios Yeast Mold Agar, Extrato de Malte, Sabouraud e Batata Dextrose Agar, na ausência e na presença de cádmio, nas concentrações de 1mM, 2mM e 3mM.

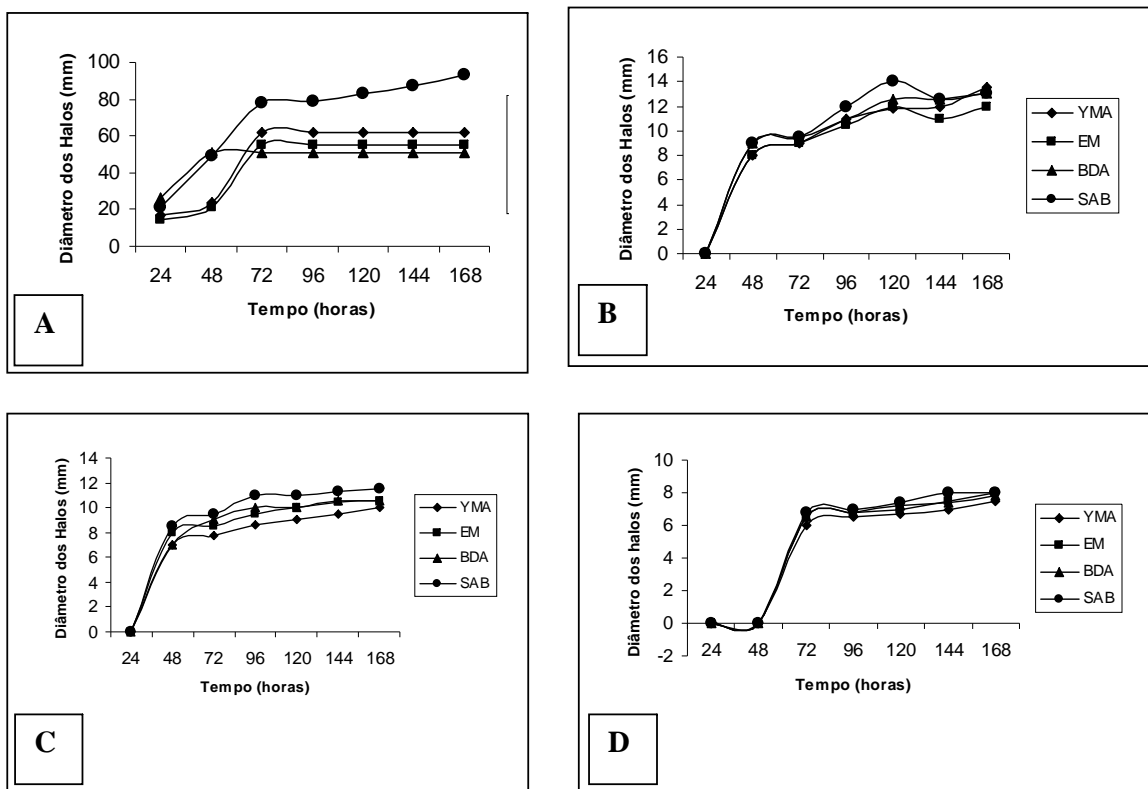


Figura 1. Curvas de Crescimento do isolado de *Trichoderma harzianum*. A. Culturas Controle; B. Culturas cultivadas em presença de 1mM de cádmio; C. Culturas cultivadas em presença de 2mM de cádmio; D. Culturas cultivadas em presença de 3mM de cádmio.

Uma análise dos gráficos permite inferir que o cultivo na ausência do metal, em

diferentes meios, resulta em perfil diferenciado de crescimento, avaliado pela expansão radial do diâmetro das colônias. Contudo, comparando-se os diferentes meios, crescimento maior foi notado para o cultivo em meio Sabouraud.

O presente trabalho avaliou o percentual de crescimento relativo do organismo para cada condição teste em relação ao controle. Os resultados apresentados revelam a influência do cádmio sobre o crescimento radial das colônias de *Trichoderma harzianum*. O cultivo em diferentes meios resultou em variações da expansão radial em meio sólido. A comparação das culturas cultivadas em diferentes meios revela o efeito inibidor do metal, o qual está diretamente relacionado à concentração utilizada.

A figura 2 apresenta os resultados do consumo de glicose e crescimento de *Trichoderma harzianum*, em meio Sabouraud líquido, na presença e ausência de cádmio.

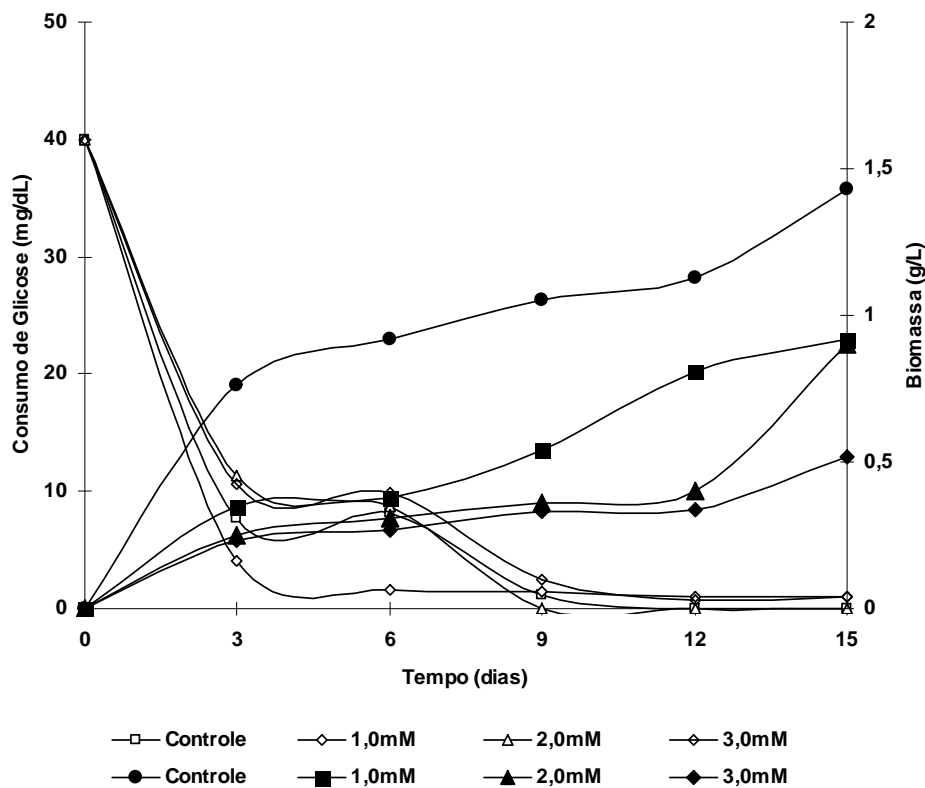


Figura 2. Perfil do consumo de glicose e Curvas de Crescimento do isolado de *Trichoderma harzianum* em meio Sabouraud líquido na presença e ausência de cádmio.

Os parâmetros usados para o acompanhamento do crescimento foram a determinação do consumo de glicose e a produção de biomassa durante 15 dias de cultivo.

Em relação à glicose verificou-se o consumo de 98%, nos primeiros três dias de cultivo, para a cultura-controle. Para a cultura tratada com 1mM de cádmio ocorreu maior consumo da fonte de carbono nos três primeiros de cultivo, aproximadamente 99%. O tratamento com 2mM do metal um consumo de 97,35% foi observado, determineo assim uma redução do consumo em relação ao controle e a cultura tratada.

Comportamento semelhante foi observado para o tratamento com 3mM do metal, um consumo de 97, 17% foi detectado. A partir do sexto dia de cultivo ocorre consumo progressivo com exaustão da fonte no 12º dia para todas as culturas.

A presença do metal induz uma significativa redução do crescimento, determinado pela biomassa celular, em relação à cultura-controle. Observou-se que, com 3 dias houve crescimento de biomassa nas amostras controle e tratadas. Entretanto, o tratamento induziu diminuição na produção de biomassa, que correspondeu a 46,31%, 32,62% e 29,99% da produção da cultura-controle, para as concentrações de 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente.

O cultivo em meio líquido permitiu acompanhar a produção de biomassa das culturas-controle e tratadas com cádmio nas concentrações de 1mM, 2mM e 3mM. Verificou-se uma diminuição do rendimento da biomassa proporcional à concentração do metal utilizada. Ao final do período experimental para a cultura tratada com 1mM de cádmio, a biomassa obtida correspondeu a 64,89% da cultura-controle. Para os tratamentos com 2mM e 3mM, as biomassas corresponderam, respectivamente, a 63% e 36,83% da massa micelial obtida para a cultura-controle.

Os efeitos tóxicos do cádmio sobre microrganismos estão bem documentados e derivam de inúmeros mecanismos. Por exemplo, a ligação do cádmio aos grupos sulfidríla acarreta a disfunção de proteínas. Paralelamente, a ligação do cádmio a nucleotídeos induz à quebra da molécula de ADN. Tais efeitos, sem dúvida, resultam em uma fase lag prolongada no crescimento celular, diminuição da densidade celular ou morte (Babich e Stotzky. 1977; Cunningham e Lundie. 1993.; Jungmann et al., 1993; Hughes e Poole. 1989; Aiking et al., 1984; Nies, 1992; Rachlin, et al., 1982. Trevors et al., 1986.)

Uma comparação entre as concentrações utilizadas neste estudo, consideradas altas para microrganismos, e os dados relatados por Kim et al (2007), testando as habilidades de crescimento de *Bacillus* frente à presença de diferentes metais, permite verificar que apenas um isolado foi capaz de crescer em 400mg/L de chumbo, cobre e zinco. Por outro lado, os autores revelaram que concentrações entre 200mg/L e 400mg/L de cádmio inibiram completamente o crescimento da bactéria. Paralelamente, os autores demonstraram a relação entre a diminuição do conteúdo total de proteínas e a presença dos metais no meio de cultivo.

Alguns relatos apontam a relação entre componentes do meio, como fontes carbono, nitrogênio e fosfato e o processo de utilização e crescimento em presença de metais pesados. De modo geral, os microrganismos avaliados exibiram redução da biomassa que os cultivados em presença de íons metálicos, mesmo em baixas concentrações, ocorrendo inibição do crescimento e indução de acumulação do metal (Sing e Yu, 1998; Donmez e Aksu, 2001).

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

conseqüentemente a variações na morfologia celular, gereo micélios altamente ramificados e encurtados (Gardea-Torresdey et al., 1997).

Wang et al (1997) revelaram a habilidade de crescimento em concentrações de cádmio superiores a 5 mM em uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de águas marinhas profundas. O organismo foi capaz de remover acima de 99% de cádmio do meio de cultivo, durante a fase exponencial de crescimento.

Por outro lado, alguns dados revelam que metais como o cádmio são geralmente tóxicos para microrganismos, mesmo em concentrações muito baixas, e que resultam na redução da produção de biomassa para diferentes microrganismos (Failla e Niehaus 1986a,1996b; Dedyukhina e Eroshin 1991).

Lopez e Vazquez (2003) demonstraram que a presença de cádmio inibiu o crescimento celular de *Trichoderma atroviride* em 50% para concentrações menores que 1mM.

Adicionalmente, diferentes variações de crescimento foram observadas na presença de cádmio em culturas de *Rhodotorula sp.* Variações na duração das fases de crescimento celular, bem como na produção de biomassa foram visualizadas em diferentes concentrações do íon metálico, geralmente menores que 1mM (LI e Yuan, 2006; Li et al., 2007).

Contudo, neste estudo, foi possível verificar que o isolado de *Trichoderma harzianum* avaliado exibiu elevado potencial de tolerância/resistência frente à presença de cádmio em concentrações de 1-3mM.

Embora tenha ocorrido consumo da fonte de carbono, a glicose, de forma relativamente semelhante entre as culturas controle e tratadas, tal resultado é positivo, pois as culturas tratadas mantêm seu crescimento mesmo após a exaustão da fonte na presença do metal, o que representa a tolerância do isolado frente à presença de cádmio.

3.2. Comportamento do polifosfato celular de *Trichoderma harzianum* em presença de cádmio

O comportamento fisiológico de *Trichoderma harzianum*, cultivado na ausência e presença de cádmio, nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, nas concentrações de 1mM, 2mM e 3mM, em relação ao conteúdo de polifosfato está apresentado na figura 3.

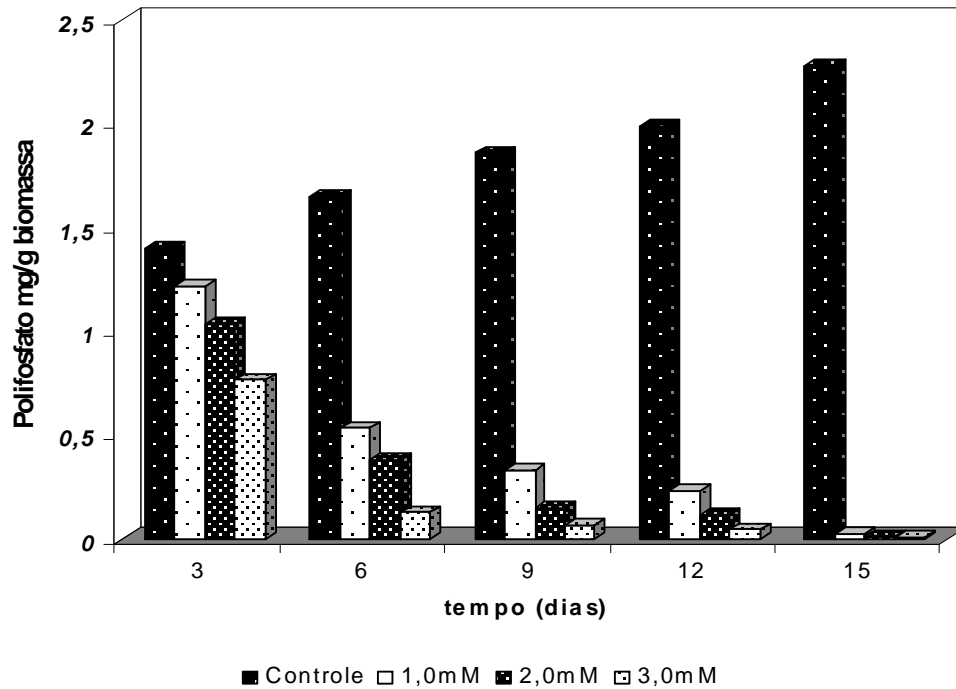


Figura 3. Perfil do polifosfato celular de *Trichoderma harzianum*, cultivado na ausência e na presença de cádmio.

Para a amostra-controle, ausência do metal, ocorreu um aumento progressivo no conteúdo de polifosfato celular. Valores correspondentes a 1,4 mg/g biomassa, 1,65 mg/g biomassa, 1,86 mg/g biomassa, 1,987 mg/g biomassa e 2,28 mg/g biomassa foram obtidos ao longo do período experimental.

Durante os 15 dias de cultivo um aumento de aproximadamente 81% no conteúdo de polifosfato foi obtido, implicando na habilidade de síntese e acúmulo de polifosfato pelo

micélio de *Trichoderma harzianum*.

Por outro lado, para as culturas tratadas com 1mM, 2mM e 3mM de cádmio, reduções de 13%, 25% e 45%, respectivamente, no conteúdo de polifosfato, foram observadas nos 3 primeiros dias de cultivo em relação à cultura-controle, embora tenha ocorrido aumento na produção de biomassa.

Ao final do período experimental o conteúdo de polifosfato total celular exibiu redução de aproximadamente 99% para todas as culturas cultivadas na presença do metal.

A literatura revela que microrganismos com habilidade de acumular polifosfato podem ser utilizados na biorremediação de efluentes contaminados com metais pesados, haja vista, vários estudos demonstrarem a associação de grânulos de polifosfato com cátions e metais pesados. Em adição, a aparente relação entre polifosfato e o aumento de resistência ou tolerância de alguns microrganismos a metais pesados reforça o seu potencial biotecnológico na remoção destes elementos (Van-Loosdrecht et al., 1997; Mino et al., 1998; Torres et al., 1998; Keasling et al., 1999; Kulaev, 2000).

Os resultados obtidos revelaram que amostras cultivadas em meio contendo o íon metálico exibiram menores conteúdos do polímero durante os 3 primeiros dias de cultivo, indicando uma diminuição significativa no conteúdo de polifosfato em presença de cádmio.

Alguns estudos apontam a ação do polifosfato na precipitação de metais, sendo o polímero um potencial candidato para processos de remoção de agentes poluidores em função de sua capacidade de quelação para metais divalentes (Keasling e Hupf, 1996; Keasling et al., 1999; Remonsellez et al., 2006).

Tem sido proposto que as células utilizam polifosfato para detoxificar metais apenas quando os íons são internalizados. Contudo, evidências mais recentes sugerem que o polifosfato é degradado durante o crescimento em presença de metais (Keasling et al., 1999;

Remonsellez et al., 2006).

A habilidade de síntese e degradação do polifosfato, determinada em procariotos, é importante para o surgimento do fenômeno de tolerância a metais pesados, em contraste com os dados que sugerem que apenas altos conteúdos intracelulares do polifosfato determinam o fenômeno (Keasling e Hupf, 1996).

Alvarez e Jerez (2004) apoiam o modelo de detoxificação de metais pesados, no qual os íons metálicos estimulam a hidrólise do polifosfato, e que os complexos metais-polifosfatos são transportados para fora da célula como, possivelmente, um mecanismo funcional da tolerância/resistência microbiana à presença desses poluentes.

A diminuição do conteúdo de polifosfato nas células cultivadas em presença de cádmio indica o aumento da necessidade de energia pela célula, o que determinaria o possível papel do polímero como reserva, sendo pois degradado ao longo do crescimento celular.

O isolado de *Trichoderma harzianum*, usado neste estudo, foi capaz de acumular polifosfato ao longo do crescimento. Na presença de diferentes concentrações de cádmio ocorreu degradação significativa de polifosfato, podendo indicar o uso do mesmo na remediação de águas contaminadas com metais pesados em plantas de tratamento de efluentes no processo de remoção de fosfato e de metais pesados.

3.3. Remoção de cádmio por *Trichoderma harzianum*

Os ensaios foram realizados de forma a avaliar a variação da concentração do metal ao longo do crescimento celular, através da determinação das concentrações residuais de cádmio no meio de cultura. Os resultados estão apresentados na figura 4.

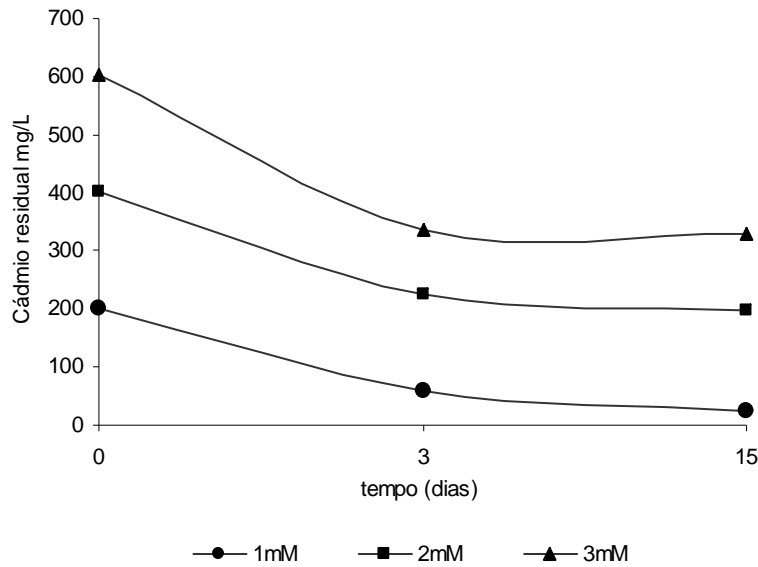


Figura 4. Remoção de íons cádmio do meio de cultura por *Trichoderma harzianum*.

Verifica-se que ocorreu uma diminuição de cádmio do meio de cultura ao longo do tempo. Além do que, a remoção foi dependente da concentração inicial utilizada. Os percentuais de remoção aos três dias de cultivo corresponderam a 71,43%, 43,87% e 44,20% para 1mM, 2mM e 3mM de cádmio, respectivamente.

Ao final do período experimental, quinze dias, percentuais de remoção de 87,13%, 50,57% e 45,69% foram obtidos para as culturas tratadas com 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente.

Os dados sugerem que o processo de remoção ocorre em uma maior velocidade durante o início do crescimento celular, seguido de uma diminuição do processo ao longo de quinze dias de cultivo.

Dados da literatura sobre a remoção de cádmio do meio de cultivo indicam que o processo, para a maioria dos organismos testados, exibe dois estágios: um inicial, no qual a

sorção é caracterizada por ser rápida e ocorre em curto intervalo de tempo, seguido por um segundo estágio, com uma velocidade menor, e que contribui pouco para a sorção total do metal (Donmez e Aksu, 2001; Malik, 2004).

Kappor e Viraraghavan (1995) também relataram que a maior taxa de remoção de metais ocorre nos estágios iniciais de crescimento.

Os dados obtidos neste estudo corroboram àqueles da literatura em relação ao comportamento de remoção em *Trichoderma harzianum*.

3.4. Eficiência de remoção do cádmio por *Trichoderma harzianum*

A figura 5 apresenta a relação entre a concentração de metal sorvida por unidade de biomassa. A eficiência de remoção foi realizada de acordo com a equação $q = (C_0 - C_f)/m$.

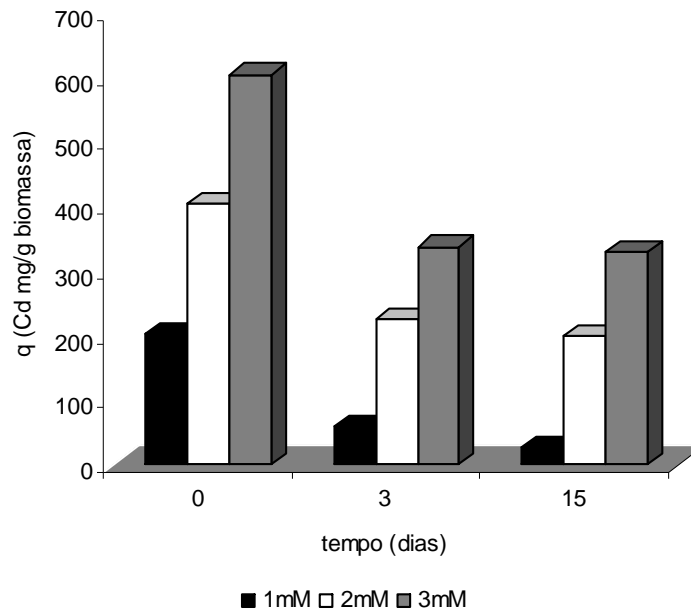


Figura 5. Eficiência de remoção de íons cádmio pelo micélio de *Trichoderma harzianum*.

Os dados demonstram que a eficiência de remoção do metal do meio de cultura aumenta com o incremento da concentração inicial do íon metálico, resultando em 101,12 mg/g/biomassa, 176,37mg/g/biomassa e 289,95mg/g/biomassa para as concentrações de 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente.

Nota-se pois, uma relação entre os estágios do crescimento celular, resultante de uma menor produção de biomassa ao longo do tempo de cultivo, e a remoção do cádmio. Ao final do período experimental ocorreu diminuição da eficiência de remoção do cádmio pela biomassa total, ocorrendo uma remoção máxima de 289,95mg/g/biomassa para a concentração de 3mM.

A remoção de ions metálicos por fungos pode oferecer um método alternativo para remediação biológica. Fungos são aplicados em uma série de processos industriais, que pode servir como uma fonte econômica e constante de biomassa. Adicionalmente, tais organismos podem crescer facilmente através de técnicas fermentativas de baixo custo (Kapoor e Viraraghavan, 1995). Dessa forma, estudos de biossorção em fungos podem representar um meio econômico para o tratamento de áreas contaminadas com metais pesados.

Inúmeras espécies de fungos exibem potencial de remoção de cádmio. *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium spp.*, *Mucor rouxii*, *Helminthosporium sp*, *Talaromyces helicus*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*, e *Saccharomyces cerevisiae*, isolados de uma área industrial poluída, foram eficientes na remoção do metal em solução aquosa. Dessa forma, tais dados revelam a habilidade de remoção do íon metálico pela biomassa celular através de mecanismos que não dependem do metabolismo ativo (Kapoor e Viraraghavan, 1999; Massaccesi et al., 2002; Goksungur et al., 2005; Acosta et al., 2007).

Os valores obtidos para a eficiência de remoção do cádmio variam de acordo com as concentrações do metal utilizadas nos experimentos. Por exemplo, Malik (2004) relatou a capacidade de isolados de *Gliocladium roseum* removerem cádmio com uma eficiência de 184mg/g de biomassa produzida. Por outro lado, Kapoor e Viraraghavan (1995) divulgaram valores entre 0.4 mg/g e 71mg/g.

Os resultados obtidos neste estudo, comparados com a literatura, revelaram uma capacidade promissora de remoção de cádmio pelo micélio de *Trichoderma harzianum* durante crescimento em presença do metal, considerando as altas concentrações utilizadas.

Adicionalmente, os ensaios realizados também revelam a habilidade de remoção do cádmio em meio de cultivo, o que significa que o processo depende do metabolismo ativo e crescimento celular como resultado da tolerância do organismo a presença do metal.

Embora tenha sido detectada a diminuição na produção de biomassa, indicando o efeito do metal sobre o crescimento celular, o cádmio total removido pelas células aumentou, estando relacionado à concentração do metal usada.

Dessa forma, o estudo apresentado revela, pela primeira vez, que o isolado de *Trichoderma harzianum* utilizado pode crescer em altas concentrações de cádmio, e conseqüentemente, o microrganismo pode ser potencialmente aplicado na biorremediação de sistemas contaminados com o metal.

4. Conclusões

Neste estudo, um isolado de *Trichoderma harzianum*, cultivado em presença de cádmio, exibiu habilidade de crescimento em altas concentrações de cádmio, sendo, contudo o perfil de crescimento relacionado à concentração do íon metálico. Paralelamente, foi demonstrado que o organismo, nas culturas controle, exibe potencial para acumulação de

polifosfato, e que tal comportamento pode ser aplicado para fins de remoção de metais em efluentes. Por outro lado, o perfil do polifosfato foi alterado como resultado da presença das diferentes concentrações de cádmio, demonstrando-se que o polímero é degradado. A habilidade de acumular e hidrolisar o polímero pode ser muito importante, não apenas para a sobrevivência celular em ambiente contaminado, mas também na sua aplicação nos processos de biorremediação. Adicionalmente, os resultados obtidos para a eficiência de remoção do metal do meio de cultivo, ao longo do crescimento celular, apontam para o potencial do isolado para estudos de remediação de metais.

Agradecimentos

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

Referências

- Acosta, I., Moctezuma-Zárate, M. G., Cárdenas, J. F., Gutiérrez, C., 2007. Bioadsorción de cádmio (ii) en solución acuosa por biomásas fúngicas biosorption of cadmium (ii) in aqueous solutions by fungal biomass. Rev. Inf. Tec., 18 (1), 9 - 14.
- Aiking, H., Stijnman, A., Garderen, C.V., Heerikhuizen, H. V., Riet, J.V., 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol., 47(2), 374-377.

- Alvarez, S., Jerez, C. A., 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9), 5177 – 5182.
- Atlas, R. M., Unterman, R., 1999. Bioremediation. In: Atlas, R.M., Untermman, R. eds. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology (ASM) Press, 2nd ed., p. 666-681.
- Babich, H., Stotzky, G., 1977. Sensitivity of various bacteria, including Actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 681–695.
- Beyersmann, D., 1994: Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicol. Lett.*, 72, 333–338.
- Bhattacharyya, M. H., Wilson, A. K., Rajan, S. S., Jonah, M., 2000. Biochemical pathways in cadmium toxicity. In: *Molecular biology and toxicology of metals* (R. K. Zalups, e J. Koropatnick, Editor), pp. 34-74. Taylor e Francis, London, U.K.
- Cunningham, D. P., Lundie, L. L., 1993. Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 7–14.
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., 2003. A review of biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Wat. Res.*, 37, 4311–4330.

Deckert, J., 2005. Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals.*, 18(5), 475-81.

Dedyukhina E.G., Eroshin V.K.1991: Essential metal ions in the control of microbial metabolism. *Proc. Biochem.*, 26, 31–37.

Donmez, G., Aksu, Z., 2001. Bioaccumulation of copper(II) and nickel(II) by the nonadapted and adapted growing *Ceida sp.* *Wat. Res.*, 35 (6), 1425-1434.

Failla L.J., Niehaus G., 1986a. Cadmium ion stimulation of growth and versicolorin synthesis in a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Exp. Mycol.*, 10: 144–149.

Failla L.J., Niehaus G., 1986b. Regulation of Zn²⁺ uptake and versicolorin. A synthesis in a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Exp. Mycol.*, 10: 35–41.

Fiske, C. H., Y.Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375-400.

Fu, Y., Viraraghavan, T., 2002. Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Adv. Environ. Res.*, 7(1), 239 .

Gadd G. M., 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia.* 46, 834-40.

- Gadd, G. M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Op. Biotech.* 11, 271 – 279,
- Gadd, G. M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.*, 124, 25-60.
- Galli, U., Schuepp, H., Brunold, C., 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.*, 92, 364-368.
- Gardea-Torresdey, J. L., Cano-Aguilera, I., Webb, R., Gutiérrez-Corona, F., 1997. Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. *Environ. Toxic.Chem.*, 16, 435-441.
- Gavrillesca M., 2004. Removal of heavy metals from the environmental by biosorption. *Eng. Life Sci.*, 4, 219–32.
- Göksungur Y, Üren S, Güvenc, U., 2005. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. *Bioresour Technol* 96:103–109.
- Gomes, N.C.M., Mendonça-Hagler, L.C.S., Savaidis, I., 1998. Metal biorremediation by microorganisms. *Rev. Microbiol.*, 29, 85-92.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 53, 1-11.

Henry, R. J., Cannon, D. C., Winkelman, J. W. 1974. Clinical chemistry, principles and technics. 2nd.ed. New York, Harper e Row.

Hughes M. N., Poole R. K., 1989. Metals and Micro-organisms. Chapman and Hall, London. Pp. 303-58.

Järup, L. 2002. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dialysis Transp.* 17, 35-39.

Jungmann, J., Reins, H. A., Schobert, C., Jentsch, C., 1993. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* 361:369–371.

Kadukova, J., Vircikova, E., 2005. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environ. Intl.* 31, 227–232.

Kapoor, A., Viraraghavan, T., Culimore, D. R., 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresour. Tech.*, 70, p. 95 – 104.

Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. Fungi biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresour. Technol.*, 53, 195–206.

Keasling, J. D., Hupf, G. A., 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 743–746, 1996.

Keasling, L. D., Van Dien, S.J., Trelstad, P., Renninger, N., McMahon, K., 1999. Application

- of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry*, 65(3), 324-331.
- Kim, S.U., Cheong, Y.H., Seo, D.C., Hur, J.S. Heo, J.S , Cho, J.S., 2007. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus spp.*) *Wat. Sc.Tech.*, 55 (1-2): 105-111 .
- Kornberg, A., Rao, N. N., Ault-Riche, D., 1999. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. *Ann. Rev. Biochem.*, 68; 89-125.
- Kratochvil, D., Volesky B., 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.*, 16(7), 291-300.
- Kulaev, I. S., 2000. Biochemistry and biotechnology of inorganic polyphosphates. *Biochemistry*, 65(3), 269 - 270.
- Kumar, G.P., Prasad, M.N., 2004. Cadmium toxicity to *Ceratophyllum demersum*: morphological symptoms, membrane damage, and ion leakage. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72(5), 1038-1045.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselweter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 139-153.

- Li, Z., Yuan, H., 2006. Characterization of cadmium removal by *Rhodotorula sp.* Y11. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73(2), 458-463.
- Li, Z., Yuan, H., Hu, X., 2007. Cadmium-resistance in growing *Rhodotorula sp.* Y11. Bioresour Technol., 99 (5), 1339-1344.
- Liu, C.H., Jay, J.A., Ford, T.E., 2001. Evaluation of environmental effects on metal transport from capped contaminated sediment under conditions of submarine groundwater discharge. Environ. Sc. Tech., 35 (11), 4549-4555.
- Lloyd, J. R., 2002. Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. Microbiol. Today, 29, 67-69.
- Lopez, E. E., Vazquez C., 2003. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. Chemosphere, 50: 137-143.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. Environ. Intl, 30, 261-278.
- Massaccesi, G., Romero, M., Cazau, M., Bucsinszky, A., 2002. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). W. J. Microbiol. Biotechnol., 18, 817-820.
- McGrath, J. W., Quinn, J. P., 2000. Intracellular accumulation of polyphosphate by the

Candida humicola G-1 in response to acid pH. Appl. Environ. Microbiol., 66(9), 4068 – 4073.

Mino, T., Vanloosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 1998. - Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. Wat. Res., 32, 3193 – 3207.

Nies, D. H., 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. Plasmid, 27, 17–28.

Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotech., 51, 730-750.

Rachlin, J. W., Jensen, T. E., Baxter, M., Jani, V., 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11, 323–333.

Remonsellez, F., Orell, A., Jerez, C. A., 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. Microbiology, 152(1): 59 - 66.

Pepper, I. L., 2000. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. Microb. Ecol. 38: 358-64.

Roane, T. M., Pepper, I. L., 1997. Microbial remediation of soils co-contaminated with 2,

4-dichlorophenoxy acid and cadmium. Proceedings of the 12th annual conference on hazardous research, Kansas City. Pp. 343-56.

Roane, T. M., Pepper, I. L., Miller, R. M., 1996. Microbial remediation of metals. In Crawford R. L. e Crawford D. L. (eds.) Bioremediation: Principles e applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp. 312-40.

Rosen, B. P., 2002. Transport e detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. Comp. Biochem. Physiol., 133, 689–693.

Sag, Y., Kutsal, T., 1995. The Selective Biosorption of Chromium(VI) and Copper(II) Ions from Binary Metal Mixtures by *R. arrhizus*. Process Biochem., 31, 561-572.

Silver, S., Mesra, T. K., 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistance. Annu. Rev. Microbiol., 42, 717–743.

Sing, C., Yu, J., 1998. Cooper adsorption and removal from water by living mycelium of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Elsevier Science, 9, 2746 – 2752.

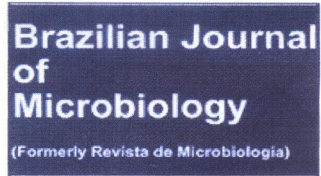
Torres, M., Goldberg, J., Jensen, T. E., 1998. Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (cyanophyceae). Microbios, 96 (385), 141 – 147.

- Trevors J. T., 1986. Mercury resistant bacteria isolated from sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 405-11.
- Van Loosdrecht, M. C., Smolders, G. J., Kuba, T., Heijnen, J. J., 1997. Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71 (1-2), 109-116.
- Vijver, M. G., Gestel, C. A. M. V., Lanno, R. P., Van-Straalen, N. M., Peijnenburg, W. J. G. M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 4705-4712.
- Villen, R. A. 2003. *Biotecnologia. Histórico e Tendências*, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>. Acesso em: 05/12/2005.
- Volesky, B., May, H., Holan, Z. R., 1993. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 826-829.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. E., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192, 95-117.
- Wang, C. L., Michels, P. C., Dawson, S. C., Kitisakkul, S., Bross, J. A., Keasling, J. D., Clark, D. S., 1997. Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4075-78.

CAPÍTULO 4

ANEXO 1

Braz. J. Microbiol. - Instructions to authors

<http://www.scielo.br/revistas/bjm/iinstruc.htm>

ISSN 1517-8382 *printed version*
ISSN 1678-4405 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope of the journal](#)
- [Submission of a manuscript](#)
- [Publication of a manuscript](#)
- [Preparation of a manuscript](#)

Scope of the journal

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short Communication: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

Mini-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

Submission of a manuscript

Submission of a manuscript to **Brazilian Journal of Microbiology** is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

Publication of a manuscript

Manuscripts are accepted for publication after having been

critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

Preparation of a manuscript

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research** papers, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results
- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 50 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For **mini-reviews**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text

- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and *mini-reviews* consist of 20 printed pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too. Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples:

Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

Resumo is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the Resumo for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

© 2008 SBM

Departamento de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214
Cidade Universitária
05508-900 São Paulo SP - Brasil
Tel. / Fax: +55 11 3813-9647

ANEXO 2



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>

BIORESOURCE TECHNOLOGY

Guide for Authors

Guide for Authors - Contents list:

Short Overview

Manuscript Preparation:

General
Structure
Text Layout
Corresponding Author
Abstract
Keywords
Symbols
Units
Maths
References
Illustrations
Colour Costs and Queries
Free Online Colour
Tables
Electronic Annexes
Supplying the Final Accepted Print Version with Disk

Other:

Notification
Copyright
PDF Proofs
Author Benefits
Online Paper Tracking
Enquiries
Useful Links

Short Overview

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.

[Back to the contents list](#)

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>.)

[Back to contents list](#)

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.

[Back to the contents list](#)

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.

[Back to the contents list](#)

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>.

[Back to the contents list](#)

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.

[Back to the contents list](#)

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.

[Back to the contents list](#)

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.

[Back to the contents list](#)

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.

[Back to the contents list](#)

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. For more information please go to our copyright page

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. 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. See [http://www.elsevier.com](#) for more information.

Online Paper Tracking:

Authors can track the status of their accepted paper online at [http://www.elsevier.com](#) using the reference supplied by the Publisher.