

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

**EFEITOS DA SALINIDADE E DE FONTES DE CARBONO NO
CRESCIMENTO, NA MORFOLOGIA DE
CUNNINGHAMELLA ELEGANS LENDNER E NA PRODUÇÃO DE
QUITINA E QUITOSANA**

MARTA CRISTINA DE FREITAS DA SILVA

**RECIFE
2006**

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

**EFEITOS DA SALINIDADE E DE FONTES DE CARBONO NO
CRESCIMENTO, NA MORFOLOGIA DE
CUNNINGHAMELLA ELEGANS LENDNER E NA PRODUÇÃO DE
QUITINA E QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biologia de Fungos, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Aluna: Marta Cristina de Freitas da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

RECIFE

2006

Silva, Marta Cristina de Freitas da

Efeitos da salinidade e de fontes de carbono no crescimento, na morfologia de *Cunninghamella elegans* Lendner e na produção de Quitina e Quitosana / Marta Cristina de Freitas da Silva. – Recife : O Autor, 2006.

72 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Microbiologia aplicada – Biologia de fungos. 2. *Cunninghamella elegans* Lendner – Crescimento, morfologia e produção de Quitina e Quitosana . 3. Variação da salinidade e fontes de carbono – Glicose e sacarose. I. Título.

**579.6
579.53**

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

**UFPE
BC2006-141**

Efeitos da salinidade e de fontes de carbono no crescimento, na morfologia de *Cunninghamella elegans* lendner e na produção de quitina e quitosana

Marta Cristina de Freitas da Silva

Orientador:

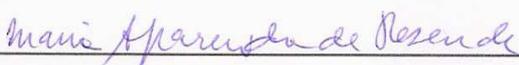


Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, PE

Examinadores:

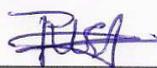


Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE

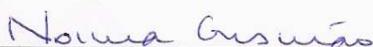


Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Resende
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG

Suplentes:



Prof^a. Dr^a. Rosa Valéria Amorim
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE

Aos meus pais, Cezar Bernardino Moreira, Raimunda de Freitas Moreira e aos meus irmãos Julius Cezar de Freitas Moreira e Marcus Antonio de Freitas Moreira, que em todos os momentos de minha vida acreditaram na minha vitória.

À Clarinha, minha vida e meu maior incentivo para prosseguir e, ao meu esposo Sérgio Guilhermino da Silva pelos momentos de amizade, companheirismo, compreensão e amor.

HOMENAGEM ESPECIAL

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”. Cora Coralina.

Descanse em paz.

Profº Dr. Francisco Cordeiro Neto, in memoriam

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me dar a vida e sempre me dizer o que fazer sem usar palavras.

Ao Dr^o Francisco Cordeiro Neto *in memoriam* pelo apoio, amizade e por ter sido o caminho que me fez chegar até a Dra. Galba.

À Prof^a Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, todo o meu respeito e admiração, por tanto profissionalismo e competência.

Ao Prof. Dr. Benício de Barros Neto, por toda a atenção dispensada durante as análises estatísticas.

A toda equipe de pesquisa que faz parte do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais -NPCIAMB, Norma Evangelista Barreto, Dr. Ricardo Kenji, Petrusk Homero, Adriana Antunes, Maria Luiza Bastos, Patrícia de Souza, Marcos Moraes, Marcos Lima e Juliana de Luna, em especial a Raquel Rufino e Thayza Stamford, pela amizade, atenção e companheirismo.

Às professoras Dr^a Ângela Coimbra e Dr^a Marilene da Silva Cavalcanti, pelos constantes incentivos e conselhos.

À coordenadora Prof^a Dr^a Leonor da Costa Maia e professores do programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelo apoio e conhecimentos transmitidos durante o nosso curso, especial à Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti.

À secretária Giovanna Guterrez do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela atenção dispensada.

À toda minha turma do Mestrado, em especial Márcia Assunção pelos momentos de descontração.

À Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, pela atenção e amizade dispensadas.

Aos técnicos Salatiel Joaquim dos Santos e Severino Humberto de Almeida pela colaboração e amizade durante a fase experimental desta pesquisa.

À Dr^a Pedrina Cunha de Oliveira que me guiou nos meus primeiros passos na Micologia, assim como todos aqueles do Departamento de Micologia da Fundação

Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/ RJ.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Pe. Theodoro Paulo Peters S. J., pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos os amigos que torcem por mim e que me ajudaram, nesta caminhada, com uma palavra de conforto e incentivo.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	III
Lista de Abreviaturas	IV
Resumo	V
Abstract	VI
1. Introdução	7
2. Objetivos	9
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos.....	9
3. Revisão Bibliográfica	10
3.1 Os Zygomycetes.....	10
3.1.1 O Gênero <i>Cunninghamella</i>	10
3.1.2 <i>Cunninghamella elegans</i> Lendner 1907.....	11
3.2 Estresse Salino.....	11
3.3 Quitina e Quitosana.....	16
3. Referências Bibliográficas	18
4. Primeiro Artigo	28
5. Segundo Artigo	53
6. CONCLUSÕES	72
7. ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formula estrutural da quitina (A) e quitosana (B). Campos-Takaki (2005)..... 17

Primeiro Artigo

Figura 1: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo glicose a 2% descrito por Hesseltine & Anderson (1957)..... 45

Figura 2: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo glicose a 4% descrito por Hesseltine & Anderson (1957)..... 45

Figura 3: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo glicose a 6% descrito por Hesseltine & Anderson (1957)..... 46

Figura 4: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo sacarose a 2% descrito por Hesseltine & Anderson (1957). 46

Figura 5: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo sacarose a 4% descrito por Hesseltine & Anderson (1957). 47

Figura 6: Consumo de Carboidratos Totais por *C. elegans* (UCP 542), em meio Hesseltine & Anderson (1957) modificado de acordo com o planejamento fatorial..... 47

Figura 7: Variações morfológicas de *C. elegans*: **A.** Meio H&A normal; **B.** Glicose 1,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 1,0 %; **C.** Glicose 4,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 1,0 %; **D.** Glicose 1,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 1,0 %; **E.** Glicose 4,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 1,0% (400X)..... 48

Figura 8: Variações morfológicas de *C. elegans*. **A.** Glicose 1,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 4,0 %; **B.** Glicose 4,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 4,0 %; **C.** Glicose 1,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 4,0 %; **D.** Glicose 4,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 4,0 %; **E.** Glicose 2,5 g/L, Sacarose 1,5 g/L, NaCl 2,5 % (400X)..... 49

Figura 9: Variações morfológicas dos esporângios de *C. elegans* (UCP 542), em meio Hesseltine & Anderson (1957) controle e modificado pelas médias das condições de acordo com o planejamento fatorial..... 50

Segundo Artigo

- Figura 1:** Quitina (A) e quitosana (B) produzidas por *C.elegans* UCP 542 e crescidas durante 216 horas, em meio Hesseltine & Anderson, variando a concentração de glicose, sucrose and NaCl, de acordo com o planejamento fatorial..... 67
- Figura 2.** O gráfico de Pareto mostra o efeito da concentração da glicose, sacarose e NaCl e os efeitos da interação entre esses fatores em quitina (A) e quitosana (B) produzidas por *C. elegans* UCP 542..... 68
- Figura 3:** Espectroscopia de Infravermelho de quitina (A) e quitosana (B) extraídos de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) crescido em meio Hesseltine & Anderson de acordo com as condições 2 e 8 do planejamento fatorial, respectivamente..... 69

LISTA DE TABELAS

Primeiro Artigo

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 43

Tabela 2: Valores de pH, NaCl, biomassa e carboidratos totais após 168 horas de incubação a 30°C, seguindo as diferentes concentrações indicadas no primeiro planejamento fatorial..... 44

Segundo Artigo

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial que estuda a influência de 3 fatores na produção de quitina e quitosana por *C. elegans*. As condições 9 a 12 referem-se ao ponto central, que equivale às médias dos dois níveis extremos..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata Dextrose Agar
YMA	Extrato de levedura e malte Agar
YMB	Caldo de extrato de levedura e malte
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamina
KBr	Brometo de Potássio

RESUMO

Investigações foram feitas no sentido de verificar o comportamento morfológico e bioquímico de *Cunninghamella elegans* Lendner UCP 542 no meio de cultura contendo diferentes níveis de salinidade e concentrações de glicose e de sacarose. *C. elegans* foi isolada do sedimento de mangues do Município de Rio Formoso, Pernambuco, Brasil. Uma curva de crescimento foi estabelecida em função da biomassa, do consumo de glicose e pH, em meio Hesseltine & Anderson (1957) com glicose a 2, 4 e 6%. Em função do planejamento fatorial o crescimento micelial de *C. elegans* foi observado e foram analisados o consumo de glicose, sacarose, NaCl e variação do pH no meio. As análises morfológicas foram realizadas acompanhando as alterações na forma dos esporângios, presença ou ausência de clamidósporos utilizando microscopia de luz. Observou-se que as condições com elevadas taxas de NaCl aumentaram o número de clamidósporos, reduziram a quantidade e alteraram a forma dos esporângios. A massa micelial obtida foi submetida ao processo de extração de quitina e quitosana realizado através do tratamento alcali-ácido e o seu líquido metabólico submetido à determinação do consumo de carboidratos totais. Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial demonstraram que as condições do meio com (1, 2,5 e 4%) NaCl não impedem o desenvolvimento do microrganismo nem o consumo das fontes de carbono e em presença de 2,5 a 4% NaCl e a quantidade de esporângios globosos diminui. Os resultados obtidos para quitina foram 41,5% na condição 2 (glicose 4g/L, sacarose 1g/L e NaCl 1%). Entretanto na condição 8 (glicose 4g/L, sacarose 2g/L e NaCl 4%), a quitosana atingiu valores de até 18,3%. Esses resultados demonstram que a 4% de NaCl e altas concentrações de glicose ocorre uma diminuição da quitina e um aumento da quitosana. A sacarose não produz efeitos semelhantes. Os resultados obtidos são promissores para a produção dos co-polímeros quitina e quitosana.

ABSTRACT

Investigations were carried out to verify the morphologic and biochemical behavior of *Cunninghamella elegans* Lendner UCP 542 in the medium of culture containing different salinities and glucose concentrations and sucrose. *C. elegans* was isolated from mangrove sediments of Rio-Formoso-Pernambuco city of Brazil. A growth curve was established in function of the biomass, of the glucose consumption and pH, in medium Hesseltine & Anderson (1957) using glucose 2, 4 and 6% concentration. In function of the factorial design the micelial growth of *C. elegans* was observed and they were analyzed of the glucose consumption, sucrose, NaCl and the pH in the medium. The morphologic analyses were accomplished the alterations in the form of the sporangioles, the presence or absence of chlamydospores using light microscopy. It was observed that the conditions with high taxes of NaCl increased the chlamydospores number, and it was reduced the amount and the form of the esporangioles. The biomass obtained was submitted to the process extraction of chitin and chitosan by the treatment of alkali-acid solutin. The liquid metabolic was submitted to the consumption of total carbohydrates. The results obtained by the factorial design demonstrated that the conditions of the medium with (1, 2.5 and 4%) NaCl not inhibited the development of the microorganism or the consumption of the carbon sources and in presence of 2.5 to 4% NaCl concentrations and the amount of globose esporangioles for in decreases. The results obtained for chitin were 41.5% in the assay 2 (glucose 4g/L, sucrose 1g/L and NaCl 1%). However the assay 8 (glucose 4g/L, sucrose 2g/L and NaCl 4%), the chitosan reached maximum values of up to 18.3%. Those results demonstrated, that to 4% of NaCl and high glucose concentrations induced to of chitin decrease and increase of the chitosan production. The sucrose does not produced similar effects. The results obtained are promising for the production of the co-polymeric chitin and chitosan.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos representam um grande grupo que biotecnologicamente, desperta um relevante interesse no mundo científico. Eles são capazes de viverem nos mais diversos habitats, influenciando e sendo influenciados pelos fatores bióticos e abióticos. Os Zygomycetes, em especial, são fungos que se caracterizam por produzirem esporos de resistência, com parede espessa como o zigósporo que se desenvolve no interior de um zigosporângio (Alexopoulos et al. 1996).

O gênero *Cunninghamella* pertence à Classe Zygomycetes, Ordem Mucorales, Família Cunninghamellaceae e tem como característica a presença de quitina e quitosana em sua parede celular (Bartnicki-Garcia 1968; Campos-Takaki 1984), podendo ser encontrado em vários ambientes, como dunas (Moreau & Moreau 1941), pradarias (Orput & Curtis 1957), turfeiras (Pavlenko 1996), águas poluídas (Cole et al. 1973), solos de deserto (Ali et al. 1975) e sedimento de estuários (Borut & Johnson, 1962; Gomes et al. 2000). O gênero *Cunninghamella* possui mais de 12 espécies descritas (Benny et al. 1992), sendo caracterizado por causar patologias conhecidas como zigomicoses, podendo na sua maioria ser constituído de espécies sapróbias, utilizando matéria orgânica, como substrato, é o caso da espécie *Cunninghamella elegans*.

Estudos taxonômicos do gênero *Cunninghamella* baseiam-se apenas em aspectos morfofisiológicos, contudo as espécies *C. elegans* e *C. bertholletiae*, particularmente, apresentam estruturas reprodutivas similares, dificultando conseqüentemente a identificação (Weitzman 1984). Novos recursos surgem para auxiliar a taxonomia morfofisiológica, como o estudo com marcadores bioquímicos. Esta metodologia tem contribuído para a resolução de vários problemas relacionados com a classificação e aspectos filogenéticos (Gusmão 1990; Muller et al. 1994; Shiosaki et al. 2001).

Estudos relatam que a adaptação dos fungos às condições de estresse ambiental, causam um processo de seleção natural (Park et al. 1993), podendo esses efeitos serem mediados pela temperatura (Mcalister & Finkelstein 1980;

Faber & Brown, 1990), salinidade (Edgley & Brown, 1983; Beever & Laracy 1986; Park et al. 1993), pressão osmótica (Mert & Dizbay 1977; Mert & Ekmekci 1987), dentre outros. As condições de estresse podem alterar a fisiologia da germinação, do crescimento e da produção de esporos (Borut & Johnson 1962).

Segundo Radwan et al. (1984) & Torzilli (1997), é importante conhecer a adaptação e o comportamento dos fungos a situações de estresse ambiental, sabendo que diversos microrganismos, possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários de considerável valor biotecnológico. Além disso, eles têm aplicações industriais promissoras especialmente na biorremediação (Kirk, 1993; Reid, 1995). Por outro lado, espécies consideradas halofílicas e/ou halotolerantes têm seus processos metabólicos aumentados com a elevação da salinidade do meio e podem apresentar grande valor industrial, desde que demonstrem habilidade de produzir importantes metabólitos secundários (Radwan et al. 1984).

A quitina é um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza, constitui o exoesqueleto dos crustáceos, insetos e a parede celular dos fungos (Andrade et al., 2000; Canela & Garcia, 2001). É um biopolímero composto de resíduos de N- acetil-D-glicosamina (GlcNAc), em ligações β 1,4.

Segundo Davis & Bartnicki-Garcia (1984), a quitosana é um produto derivado da N-acetilação da quitina pela enzima quitina deacetilase e é um polissacarídeo que desperta um grande interesse das indústrias bioquímicas e farmacológicas (Tharanathan & Kutter, 2003), podendo ser encontrada na natureza, na parede celular dos Zygomycetes e em algas do gênero *Chlorella* (Mihara, 1961).

Ambos os compostos apresentam uma vasta aplicabilidade, tais como: na remoção e recuperação de diferentes resíduos (Muzzarelli 1977; Ramachandran & Madhaven, 1982), na biotransformação de pesticidas (Thome & Van Daele, 1986), na degradação de corantes (Mckay et al., 1982; Venkatrao et al., 1986), aminoácidos (No & Meyers, 1989) e proteínas (Knorr, 1991). A quitosana é utilizada ainda na Bio-medicina, Biotecnologia, Agricultura, fábrica de shampoos, pasta de dente, lentes de contato, recuperação de proteínas, tratamento da

poluição, indústria de adesivos, clarificação de sucos (Imeri & Knorr, 1988) e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens (Mayer et al., 1989) e cosméticos (Synowiecki, 1986).

Considerando as observações morfofisiológicas descritas por (Santiago 2004) para *C. elegans* UCP 542. Este estudo foi desenvolvido visando os seguintes objetivos:

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o comportamento morfológico e bioquímico de *Cunninghamella elegans* Lendner UCP 542 no meio de cultura contendo diferentes salinidades e concentrações de glicose e de sacarose.

2.2 Específicos

- Avaliar o perfil de crescimento de *C. elegans* no meio contendo diferentes salinidades e concentrações de glicose e de sacarose;
- Avaliar o comportamento morfológico de *C. elegans* no meio com diferentes salinidades e concentrações de glicose e de sacarose;
- Analisar possíveis efeitos do meio contendo diferentes salinidades e concentrações de glicose e sacarose no conteúdo dos polímeros (quitina e quitosana) de *C. elegans*;
- Caracterizar físico-quimicamente os polímeros quitina e quitosana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os Zygomycetes

A Classe dos Zygomycetes possui representantes em vários ambientes como: solo, água, fezes, grãos estocados, frutos, folhas, vegetais vivos, outros fungos e animais vertebrados e invertebrados (Cardoso et al., 1992) e têm como características principais hifas cenocíticas com septos apenas para diferenciar as estruturas reprodutivas, esporângios ou gametângios, rizóides que fixam o fungo ao substrato e estolões. A reprodução dos Zygomycetes ocorre assexuada ou sexuadamente, pela produção de esporangiosporos no interior de esporângios ou por copulação gametangial, respectivamente. Algumas espécies produzem clamidosporos, podendo ser sapróbias, outras simbiontes como as micorrizas e parasitas de outros fungos, animais e plantas (Alexopoulos et al., 1996).

Os Zygomycetes são fungos que podem produzir esporos de resistência, de parede celular rígida, chamado de zigosporo cujo desenvolvimento se dá no interior de zigosporângios após a fusão completa entre dois gametângios que em alguns casos surgem do mesmo micélio.

3.1.1 O Gênero Cunninghamella

O gênero *Cunninghamella* encontra-se dentro da ordem Mucorales. O habitat dessas espécies é geralmente o solo e outros substratos orgânicos. Os representantes exibem colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangiolos. O micélio quando jovem não exhibe septo. A septação está associada à idade da cultura (Baijal & Mehrotra, 1980; Domsch, 1980).

Os esporos podem ser globosos ou ovais com paredes lisas ou com espículas, geralmente unicelulares. As espécies podem formar zigosporos globosos, escuros e tuberculados que são formados entre células suspensoras,

geralmente heterotáticas, clamidósporos podem ocasionalmente ser formados (Domsch *et al.*, 1980).

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

3.1.2 *Cunninghamella elegans* Lendner 1907

Apresenta colônias a princípio brancas tornando-se cinzas. Vesículas subglobosas e esporângios, globosos a subglobosos, apresentando coloração marrom pálida, quando maduros, e espinhosos. Rizóides presentes. Zigosporos globosos amarronzados (Baijal & Mehrotra, 1980). Domsch *et al.*, 1980 descreve que os esporangióforos podem atingir até 20,0 µm em comprimento e que as vesículas terminais podem chegar à 40,0 µm de diâmetro e as laterais de 10-30 µm. Shipton & Lunn (1980) reportaram que os esporângios de vários isolados de *C. elegans* apresentaram formas globosas, subglobosas e raramente elipsoidais.

3.2 Estresse Salino

A germinação e o crescimento dos fungos são sensíveis a uma grande variedade de condições ambientais incluindo a disponibilidade de nutrientes, temperatura, condições de umidade, salinidade e concentração de hidrogênio (Park *et al.*, 1966).

Foram estudados os efeitos da temperatura e salinidade na esporulação assexual de duas amostras de *Saprolegnia parasitica* e constatada uma alta tolerância à salinidade em se tratando do crescimento vegetativo em ambas as

amostras. Em relação a temperatura, a germinação dos zoosporos só diminuiu após 12 horas (Harrison et al 1971).

Jones (1963) estudou os efeitos da salinidade no crescimento de *Cremasteria cymatilis*, *Sporidesmium salinum* e *Lutworthia floridana* em meio de cultura contendo 10-100% de água do mar. Os resultados mostraram que a taxa de crescimento de *Cremasteria* foi afetada pela variação da salinidade do meio, tendo este fungo exibido elevada halotolerância. As outras espécies estudadas tiveram seu crescimento aumentado em relação à elevação da concentração salina demonstrando, portanto, comportamento halofílico.

A taxa de crescimento dos Pyrenomycetes *Gaumannomyces graminis* e *Lulworthia meduza* em salinidades de 0-28 %, foi alvo dos estudos de Davidson (1974). Embora ambas as espécies pudessem crescer dentro da faixa da salinidade testada, o crescimento de *G. graminis* foi mais rápido em meio de água oceânica, sendo o oposto verdadeiro para a *L. meduza*, a qual cresceu em meios de concentrações salinas elevadas.

Os efeitos da salinidade no crescimento de *Aspergillus niger* e *Paecilomyces lilacinum*, isolados de solo, foi realizada por Mert & Dizbay (1977). Colônia crescidas por quatorze dias em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) foram transferidos para o meio líquido Extrato de Malte contendo 1, 2, 3, 5, 7 e 9% de NaCl e incubadas por quatorze dias à 27°C. O peso seco foi determinado gravimetricamente e a pressão osmótica do meio determinada com “Knauer osmometer”. Os resultados mostraram que o crescimento vegetativo nas duas espécies foi máximo em meios com 3% de NaCl e 15,5-15,75 atm, sendo reduzido com a elevação da concentração salina dos meios de cultura.

Ekundayo (1979) observou o comportamento de determinadas espécies de fungos patogênicos ao homem como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Geotrichum candidum*, *Hormodendrum compactum*, *Microsporum audouinii*, *Nectria cinnabarina* e *Sporotrichum schenckii*, foi pesquisado em Sabouraud modificado com 0,85; 1,7; 3,4 e 6,8% de NaCl ou água do mar e verificou que a maioria das espécies

cresceram em até 3,4% de NaCl e na água do mar, porém, quatro espécies cresceram a 6,8% NaCl.

Griffin (1981) verificou o crescimento de diversos fungos em diferentes salinidades, criando variados potenciais osmóticos. Os resultados mostraram que várias espécies de fungos podem exibir tolerância a uma ampla variação de salinidade e potenciais osmóticos entre -5 e -40 Mpa. Espécies xerotolerantes como *Aspergillus nidulans* foram caracterizados por um ótimo crescimento radial em resposta a um potencial osmótico igual ou inferior a -5 Mpa (0,8 M NaCl).

Radwan et al (1984) desenvolveram estudos com fungos em 3 solos salinos egípcios e 1 solo controle. O número de isolados no solo controle superou os dos solos salinos. Quatro isolados de *Penicillium* mostraram um comportamento halofílico. *Fusarium spp* e *Aspergillus terreus* são tolerantes a 9 e 10% de NaCl. Alguns isolados tiveram tolerância de 30% de cloreto de sódio no meio nutritivo como é o caso do *Penicillium notatum*.

Um estudo sobre germinação dos zoósporos de *Lagenidium giganteum*, sob várias concentrações de cloreto de sódio (0, 0,2, 0,4 e 0,6g/L), foi desenvolvido por Lord & Roberts (1985), os quais utilizaram cinco amostras isoladas de diferentes espécies de mosquito em várias regiões dos EUA. Em todos os isolados houve um decréscimo na germinação dos zoósporos devido o aumento da salinidade em relação ao controle (meio sem NaCl). Na presença de 0,6g/L de NaCl os zoósporos de todas as amostras praticamente não germinaram. Apenas uma amostra apresentou germinação em 0,2 e 0,4g/L de NaCl.

O fungo *Debaryomyces marama* foi isolado de presunto defumado fabricado na Espanha por Monte et al., (1986). O efeito do NaCl foi investigado a partir da inoculação de esporos no meio YEPD adicionado de 4, 8, 12, 16 e 20% de cloreto de sódio. *D. marama* foi capaz de crescer em todas as salinidades testadas, com a redução do crescimento em elevada concentração de sal do meio de cultura.

Os efeitos da salinidade e da pressão osmótica no crescimento vegetativo e reprodutivo de *Aspergillus flavus* e *Penicillium chrysogenum* foram observados por Mert & Ekmekci (1987). O crescimento vegetativo de ambas espécies foi superior quando aumentada a quantidade de NaCl no meio nutritivo. O crescimento

máximo vegetativo foi observado em *A. flavus* e em *P. chrysogenum* no meio nutritivo contendo 9% de NaCl, comparado ao controle. A salinidade e pressão osmótica têm inibido a produção de conídios de *A. flavus*, porém, em *P. chrysogenum* essas condições são estimulantes.

Para verificar os efeitos da salinidade na germinação de *Glomus mosseae*, Estaun (1989) plaqueou clamidósporos deste fungo em Agar Água 1% ajustado osmoticamente para seis diferentes concentrações de NaCl e pH 7. Cada placa, contendo de cinco a seis esporos viáveis, foi incubada no escuro na temperatura de 25°C e a germinação verificada depois de 3, 6, 14 e 22 dias. O crescimento do tubo germinativo foi verificado pela adição do trypan-blue com a ajuda de uma grade 50µm x 50 µm. Os resultados mostraram que baixas concentrações de NaCl (até 2mg de NaCl/mL) não afetaram significativamente a taxa de germinação dos esporos. A germinação foi afetada com a adição de 4 mg de NaCl/mL, tornando-se praticamente nula com a concentração de 8 mg de NaCl/mL.

Park et al (1993), pesquisaram a adaptação do *Aspergillus niger* em condições de estresse salino em meio PDB (batata dextrose líquido) com diferentes concentrações de NaCl ao meio de cultura e observaram que com 0,25% e 0,5% NaCl houve crescimento. Com 0,75%, o crescimento manteve-se lentamente, com 1,0 % houve uma interrupção de apenas 30 minutos voltando em seguida a crescer. Com 1,5%, não houve crescimento.

Ravishankar et al. (1994), observaram influência de diferentes salinidades (34,5 ‰; 20,7 ‰; 6,9 ‰) sob a composição dos ácidos graxos de um fungo marinho *Cirrenella pygmea*. Esse estudo revelou que a composição dos ácidos graxos de fungos marinhos é alterada por fatores externos tais como a salinidade e que tais alterações são similares àquelas registradas por alguns fungos halofílicos.

As estratégias, dos fungos marinhos, estudadas por Clipson & Hooley (1995) são utilizadas para resistirem a grandes concentrações de sal no mar, acumulando solutos como glicerol, manitol, íons Na e Cl no seu citoplasma que permitirão o influxo da água pela célula fúngica.

Um estudo sobre o crescimento de fungos decompositores de alimentos em um meio de cultura sólido em várias temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 37 °C) e concentrações de NaCl (0; 0,1; 0,4; 1,0; 3,0; 5,0 e 7,0%), foi estudado com o objetivo de relacionar a taxa de crescimento com a temperatura e a concentração de sal (Cuppers et al. 1997).

Quarenta amostras de *Aspergillus fumigatus* isoladas do solo e água, salgados foram mantidas em meio contendo diferentes concentrações de NaCl, glicose e temperaturas de 30°C e 50°C por Tepisic et al (1997). Posteriormente determinaram a produção de micotoxinas importantes como verruculogen, fumitremorginas B e C e fumigaclavina A, através da cromatografia de camada delgada (TLC) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Castillo & Demoulin (1997) relacionaram os efeitos da temperatura e salinidade ao crescimento dos basidiomicetos *Microporus xanthopus*, *Pycnoporus sanguineus* e *Schizophyllum commune*. Os resultados indicam que *M. xanthopus*, *P. sanguineus* são sensíveis a salinidade, porém *P. sanguineus* se destaca por apresentar uma alta tolerância a variações de temperatura e *S. commune* por resistir a grandes variações de temperatura e salinidade.

Edwards et al (1998) desenvolveram um estudo morfológico e fisiológico em *Dendryphiella salina* e *D. arenaria* em relação a sua capacidade de adaptação no oceano, sendo observadas alterações no crescimento das colônias desses fungos e na forma de seus esporos. Foram utilizados cinco diferentes isolados de cada espécie os quais foram inoculados em "Agar corn meal" (CMA) contendo diferentes concentrações de NaCl (0-10 M). Quando crescidos em CMA com elevadas concentrações de cloreto de sódio, foram produzidos conídios mais curtos em ambas as espécies. Todos os isolados foram capazes de crescer na concentração de 0,5 M de NaCl, embora houvesse uma significativa inibição quando comparados ao controle (CMA sem NaCl). Diferentes isolados apresentaram comportamento variados, com um dos isolados de *D. salina* mostrando-se marcadamente menos tolerante à salinidade.

A influência da salinidade no crescimento do basidiomiceto *Nia vibrissa* foi verificada por Helmholtz et al., (1999). O meio utilizado foi Hagem Agar adicionado

de 0, 10, 25, 50, 100 e 150‰ de NaCl e pH 7,5. Os resultados mostraram que *Nia vibrissa* é capaz de crescer em todas as concentrações utilizadas excetuando-se a de 150‰, tendo o fungo demonstrado preferência por salinidades entre 5-25‰.

3.3 Quitina e Quitosana

Os polissacarídeos, também denominados de glicanos, diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas, nos tipos de ligação que os unem, no comprimento de suas cadeias, e ainda, no grau de ramificação das mesmas (Figura 1).

Em recentes estudos, várias espécies fúngicas têm sido identificadas como fontes alternativas na produção de quitina e quitosana, entre estas: *Phycomyces blakesleanus*, *Mucor rouxii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Absidia coerulea* e *Cunninghamella blakesleana* (Muzzarelli, 1977; Knorr et al., 1989).

Em função do amplo campo de aplicação da quitina e quitosana, estes polissacarídeos têm sido extensivamente estudados na atualidade. A fonte tradicional para obtenção de quitina são os exoesqueletos de crustáceos, contudo, existem várias limitações em relação à utilização destes animais, tais como: a adaptação ao clima, os locais de confinamento e o processamento em larga escala associado com a conversão química de quitina em quitosana, que limitam a viabilidade do processo de obtenção para estes polissacarídeos (White et al., 1979; Mathur & Narang, 1990).

A quitosana é derivada da N-desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando assim diversos derivados da quitosana. A molécula de quitosana (poli- β -(1-4)-D-glucosamina) tem um grupo amino e um grupo hidroxil os quais podem ser modificados pelo uso de drogas, desta forma pode-se modificar as propriedades da quitosana (Sano et al. 1991).

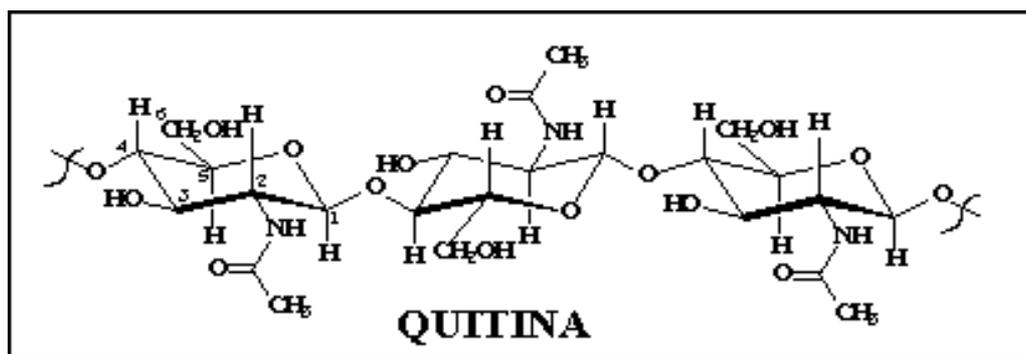
A quitina, com exceção da celulose é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído, servindo como elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (Kent, 1964; Kafetzopoulos, 1993).

Schembri & Klemm (1998), relataram a ocorrência de sítios de ligação para metais pesados na superfície celular de microrganismos que se tornam alvos específicos para estes elementos, em um mecanismo que pode ser comparado ao processo chave-fechadura, que ocorre com as enzimas, devido à composição destas moléculas.

Chitnis & Deshpande (2002) estudaram os parâmetros para o isolamento e regeneração de protoplastos em células leveduriformes e filamentosas de um Zygomycete dimórfico denominado *Benjaminiella poitrasii*.

O método por cromatografia em camada líquida de alta performance (HPLC), foi utilizado por Zhu et al (2005) para quantificar a glucosamina e verificar a pureza da quitina em materiais biológicos e produtos alimentícios. O método foi escolhido por ter boa linearidade, precisão.

A



B

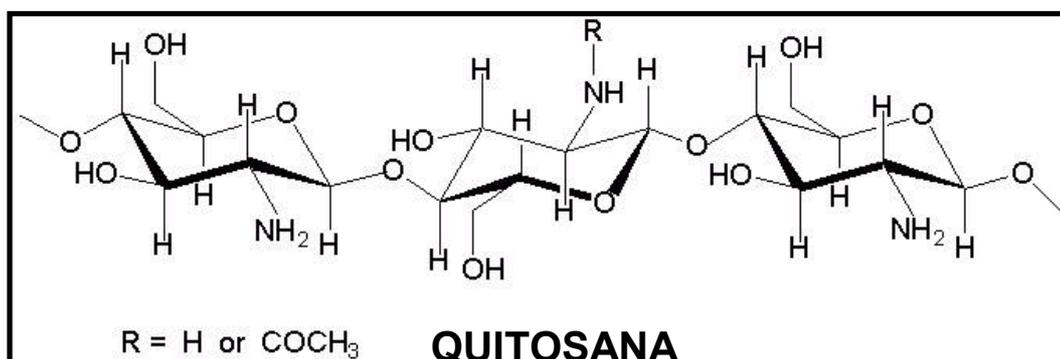


Figura 1: Fórmula estrutural da quitina (A) e quitosana (B). Campos-Takaki (2005).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexopoulos, C. J.; Mims, C.W.; Blackwell. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Sons. *New York*. 868p.

Ali, M.I.; Botanoury, K.H.; Salama, A.M. 1975. Studies of the fungal flora of Egyptian soils. 2. Different habitats in the Wadi hof. *Pedobiol.* 15: 13-19.

Andrade, V.S.; Neto, B. B.; Souza, W.; Campos-Takaki, G. M. 2000. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can J Microbiol.* 46: 1042-1045.

Baijal, U. & Mehrotra, B. S. 1980. The genus *Cunninghamella* – reassessment. *Sydowia.* 33: 1-13.

Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 98-108.

Beever, R.E. & Laracy, E.P. 1986. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bact.* 168: 1358-1365.

Benny, G.L.; Benjamin, R.K.; Kirk, P.M. 1992. A reevaluation of Cunninghamellaceae (Mucorales). Sigmoidiomycetaceae fam. nov

reticulocephalis gen. nov.; cladistic analysis and description of two new species. *Mycologia*. 84: 615-641.

Borut, S. Y. & Johnson, T. W. Jr. 1962. Some biological observations on fungi in estuarine sediments. *Mycologia*, 54: 181-193.

Campos-Takaki, G. M. 1984. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais das paredes celulares de fungos da ordem Mucorales (Zygomycetes). São Paulo. 242 p.

Campos-Takaki, G. M. 2005. The fungal versatility on the co-polymers chitin and chitosan production. Dutta, P.K. Chitin and Chitosan Opportunities & Challenges (Ed.). SSM International Publication. Contai, Índia. p59-94.

Canella, K.M.N.C. & Garcia, R.B. 2001. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Quim. Nova*, 24 (1): 13-17.

Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. 1992. *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do solo, Campinas/SP. 360p.

Carlile, M. J. & Watkinson, S. C. 1996. The fungi. Tokyo, Academic press.

Castillo, G. & Demoulin, V. 1997. NaCl salinity and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. *Mycol. Res.* 101 (3): 341-344.

Chitnis, M.V. & Deshpande, M.V. 2002. Isolation and regeneration of protoplasts from the yeast and mycelial form of the dimorphic zygomycete *Benjaminiella*

poitrasii: Role of chitin metabolism for morphogenesis during regeneration .
Microbiological Research. 157 (1): 29-37.

Clipson, N. & Hooley, P. 1995. Salt Tolerance Strategies in Marine Fungi.
Mycologist. 9 (1): 3-5.

Cole, R. J.; Kirksey, J.W.; Cutlerm, H.G.; Douppnic, B.L.; Peckham, J. C. 1973.
Toxin from *Fusarium moniliforme*. Effects on plants and animals. *Science*. 179:
1324-1325.

Cuppers, H. G. A. M.; Oomes, S.; Brul, S. 1997. A Model for the Combined Effects
of Temperature and Salt Concentration on Growth Rate of Food Spoilage
Molds. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (10): 3764-3769.

Davis, L. L. & Bartnicki-Garcia, S. 1984. The co-ordination of chitin and chitosan
synthesis in *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol*. 130: 2095-2102.

Davison, D. E. 1974. The of salinity on a marine and a freshwater Ascomycete.
Can. J. Bot., 52: 553-563.

Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi,
Academic Press. 1: 120.

Edgley, M. & Brown, A.D. 1983. Yeast water relations: physiological changes
induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces
rouxii*. *J. Gen. Microbiol*. 129: 3453-3463.

Edwards, J.; Chamberlain, D.; Brosnan, G.; West, D.; Stanley, M. S.; Clipson, N. J. W.; Hooley, P. 1998. A comparative physiological and morphological study of *Dendryphyella salina* and *D. arenaria* in relation to adaptation to life in the sea. *Mycol. Res.*, 102 (10): 1198-1202.

Ekundayo, C. A. 1979. Effect of sodium chloride and seawater in Sabouraud dextrose ágar medium em some human-pathogenic fungi. *Can. J. Bot.* 57: 2418-2421.

Estaun, M. V. 1989: Effect of sodium chloride and mannitol on germination and hyphal growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agric. Ecosystems Environ.*, 29: 123-129.

Faber, J.M. & Brown, B.E. 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. and Environ. Microbiol.* 56: 1584-1587.

Gomes, P.F.; Nascimento, A.E.; Okada, K.; Messias, A.S.; Sharia, A.E.N.; Campos-Takaki, G. M. 2000. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and projects. p82.

Griffin, D. M. 1981. Water & Microbial stress. *Adv. Microb. Ecol.* 5: 91-136.

Gusmão, N.B. 1990. Estudo com marcadores bioquímicos (Coenzima Q e ácidos graxos) na taxonomia de leveduras do gênero *Candida* (Robin) Berkhout. Recife.

Harrison, J. L. & Gareth-Jones, E. B. 1971. Salinity Tolerance of *Saprolegnia parasitica* Coker. *Mycopathologia et Mycologia applicata*. 43 (3-4): 297-307.

Helmholz, H.; Etoundi, P.; Lindequist, U. 1999. Cultivation of the marine Basidiomycete *Nia vibrissa* (Moore & Mayers). *J. Biotechnol*, 70: 203-306.

Hesseltine, C.W., & Anderson, R.F. 1957. Microbiological production of carotenoids. *Mycologia*. 49: 449-452.

Imeri, A. R. & Knorr, D. 1988. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J. of Food Scien.*, 53. 1707-1709.

Jones, E. B. G. The effect of cations on certain marine fungi. 1963. (Ph.D. Thesis. University of Leeds).

Kafetzopoulos, D. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(7): 2564-2568.

- Kent, P. W. 1964. Chitin & Mucosubstances. In: Florkin, M. and Mason, H. S. (eds.) *Comparative Biochemistry*. New York. *Academic Press Inc.*, 7: 93-136.
- Kirk, T. K. 1993. Lignin degradation: basic research progress, and applications in soil remediation and biopulping. In *Cellulosics Pulp. Fibre and Environmental Aspects*. 421-430.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.*, 45. 114-122.
- Knorr, D.; Beaumont, M. D.; Pandya, Y. 1989. Potencial of acid soluble and water-soluble chitosan in biotechnology. In *Chitin and chitosan*. Edited by G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, & P. Sandford. *Elsevier: London, N.Y.* pp. 101-118.
- Lord, J. C. & Roberts, D. W. 1985. Effects of salinity, pH, organic solutes, anaerobic conditions, and the presence of other microbes on production and survival of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagediniales) zoospores. *J. Invertebr. Pathol.*, 45: 331-338.
- Mathur, N. K. & Narang, C. K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polyssaccharides from marine animals. *J. Chem. Edu.* 67: 938-942.
- Mayer, J.; Wiley, B.; Hunderson, K.; Kaplan, D. 1989. Physical properties of films produced from the biopolymers pullulan and chitosan produced by *Aerobasidium pullulans* and *Mucor rouxii* Am. Soc. *Microbiology*. ASM, Washington DC. USA.

Mcalister, L. & Finkelstein, D.B. 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 819-824.

Mckay, G.; Blair, H. S.; Gardner, J. R. 1982. Absorption of dyes on chitin. I. Equilibrium Studies. *J. Appl. Polym. Sci.*, 27. 3043-3045.

Mert, H.H. & Dizbay, M. 1977. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species. *Mycopathol.* 61: 125-127.

Mert, H.H. & Ekmekci, S. 1987. The effect of osmotic pressure and of the medium on the growth and sporulation and changes in the total organic acid content of *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*. *Mycopathol.* 100: 85-89.

Mihara, S. 1961. Change in glucosamine content of *Chlorella* cells during the course of their life cycle. *Plant Cell Physiol.* 2:25-29.

Monte, E.; Villanueva, J.R.; Domínguez, A. 1986. Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *Int. J. Food Microbiol.*, 3: 355-359.

Moreau, N. & Moreau, F. 1941. Premiere contribution a R' Etude de la microflore des dunes. *Rev. Mycol.* 6: 49-94.

Muller, M.M.; Kantola, R.; Kintunen, V. 1994. Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycol. Res.* 98: 593-603.

Muzzarelli, R. A. A. 1977. Chitin. *Pergamon Press. New York.*

No, H. K. & Meyers, S. P. 1989. Recovery of amino acids from seafood processing waste water with a dual chitisan-based ligand exchange system. *J. Food Sci.* 54: 60-70.

O'Donnel, K. L. 1979. Zygomycetes in culture. *University of Georgia.* p257.

Orput, P.A. & Cutis, J.T. 1962. Soil microfungi in relation to the prairie continuum in Wisconsin. *Ecol.* 38: 628-637.

Park, J. C.; Matsuoka, H.; Takatori, K.; Kurata, H. 1966. Adaptation of *Aspergillus niger* to acidic conditions and its relationship to salt stress and miconazole. *Mycol. Res.* 100: 869-874.

Park, J.C.; Nemoto, Y.; Homma, T.; Jing, W.; Chen, Y.; Matsuoka, H.; Ohno, H.; Takatori, K.; Kurata, H. 1993. Adaptation to *Aspergillus niger* to Short-term salt stress. *Applied. Microbiol. Biotechnol.* 40: 394-398.

Pavlenko, V.F. 1996. Specific composition of the fungi of some peat fields, soils and Brown coals of Zhitomir region. *Zbl. Mikrobiol.* 28: 33-38.

- Radwan, S.S.; El-Essawy, A.A.; Helal, G.A. 1984. Salinity-loving fungi in Egyptian soils 1. Numbers, identities, and halophilism. *Zbl. Mikrobiol.* 139: 435-440.
- Ramachandran, N. K. & Madhavan, P. 1982. Metal binding properties of chitosan from different sources. *Jap. Soc. Of Chitin and Chitosan. Sapporo.* 314-322.
- Ravishankar, J. P.; Muruganandam, V.; Suryanarayanan, T. S. 1994. Effect of Salinity on Fatty Acid Composition of *Cirrenella pygmea*, an Obligate Marine Fungus. *Botanica Marina.* 37: 479-481.
- Reid, I. D. 1995. Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany.* 73: Suppl. 1. 1011-1018.
- Sano, H.; Matsukubo, T.; Shibasaki, K.; Itoi, K.; Takaesu, Y. 1991. Inhibition of oral Streptococci to saliva treated hydroxyapatite by chitin derivatives. *Bull Tokyo Den. Coll.* 32(1): 9-17.
- Santiago, A.L.C.M. 2004. Efeitos da salinidade e da temperatura na germinação no crescimento radial e na morfologia de *Cunninghamella elegans* Lendner. *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- Schembri, M. A. & Klemm, P. 1998. Heterobinary Adhesins Based on the *Escherichia coli* FimH Fimbrial Protein. *Appl Environ Microbiol.* 64 (5) 1628-1633.
- Shiosaki, R.K.; Okada, K.; Gusmão, N. B.; Nigam, P.; Falcão, P. S.; Silva, N. H.; Fukushima, K.; Miyaji, M. 2001. In taxonomy of the genus *Cunninghamella*. 18: 123-127.
- Shipton, W. A. & Lunn, J. A. 1980. Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 74(3): 483-491.
- Synowiecky, J. 1986. Use of Krill Chitin as an enzyme support. In Chitin in Nature and Technology, ed R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G. Gooday. *New York.* 417-420.

- Tepsic, K.; Gunde-Cimerman, N.; Frisvad, J. C. 1997. Growth and mycotoxin production by *Aspergillus fumigatus* strains isolated a saltern. *FEMS Microbiology Letters*. 9-12.
- Tharanathan, R.N. & Kittur, F.S. 2003. Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43 (1): 61-87.
- Thome, J. P. & Van Daele, Y. 1986. Adsorption of polychlorinated biphenyls (PCB) on chitosan and application to descontamination of polluted stream waters. In *Chitin in Nature and Technology*, ed R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. Gooday. New York, p551-554.
- Torzilli, K. 1997. Studies on the japanese marine fungi lignicolous group (111), algicolous group and a general consideration. *Annual Report, Institute for Fermentation, Osaka*.
- Venkatrao, B.; Baradajaran, A.; Satry, C. 1986. Adsorption of dyestuffs on chitosan. In: *Chitin en Nature and Technology*, ed. R.A.A. *Plenum Press, New York* p554-559.
- Weitzman, I. The Case for *Cunninghamella ellegans*, *C. bertholletiae* and *C. echinulata* as separate species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83(3).1984.
- White, S. A.; Farina, P. R.; Fulton, I. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 323-328.
- Zhu, X. L.; Cai, J. B.; Yang, J.; Su, Q. D. 2005. Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research*. 340 (10): 1732-1738.

Primeiro Artigo

**ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NA MORFOLOGIA
DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* MEDIADAS PELO
ESTRESSE SALINO**

Manuscrito a ser submetido para publicação no:

FEMS Microbiology Ecology

ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NA MORFOLOGIA DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* MEDIADAS PELO ESTRESSE SALINO

Marta Cristina de Freitas da Silva^{1,3}; Galba Maria de Campos-Takaki^{2,3*}

¹Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife PE, Brasil. CEP: 50670-420; ²Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco. Recife-PE, Brasil. CEP: 50050-590; ³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco. Recife-PE, Brasil. CEP: 50050-590;

* Autor para correspondência – Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. UNICAP. Boa Vista. Recife - PE
CEP 50050-590/Fax: 081 3216 4043 - Email: takaki@unicap.br

ABSTRACT

In this work, studies were carried out evaluating the influence of the salinity (0, 1.0, 2.5 and 4.0 % of NaCl), associated the glucose (1.0, 2.5 and 4.0 g/L) and sucrose (1.0, 1.5, 2.0 g/L), in the growth and the morphology of isolated *Cunninghamella elegans* isolated from mangrove sediments of city Rio Formoso-PE-Brazil. The growth was carried out in the medium Hesseltine & Anderson, added of different concentrations of NaCl and carbon sources. The morphologic analyses was realized following the alterations in the form and size of the sporangioles caused for the stress conditions of saline, exactly in the presence of the carbon sources glucose and sucrose. It was still observed, a reduction in the growth of *C. elegans* mainly, with the concentrations of 2.5 and 4.0% of NaCl. The observations using the light microscope had demonstrated alterations in the sporangioles, verifying themselves that, in concentration 1.0% of NaCl. The number of ellipsoids sporangioles increased of 10%. In the concentrations of 2.5 and 4.0% of NaCl the globose sporangioles showed a discrete reduction from 68% for 44%, while that the ellipsoids increased of 5% for 10 and 11%, respectively. And still, in conditions 2.5 and 4% of NaCl were observed the presence of chlamidospores and small ramifications of the mycelium. The results were contributed for a better knowledge of the decurrent biological phenomena of stresses it for the salinity, in fungi from mangrove.

Key words: *Cunninghamella elegans*, morphology, salinity, glucose and sucrose

RESUMO

Neste trabalho, estudos foram realizados avaliando a influência da salinidade (0, 1,0, 2,5 e 4,0 % de NaCl), associada a concentração da glicose (1,0, 2,5 e 4,0 g/L) e sacarose (1,0, 1,5, 2,0 g/L) no crescimento e na morfologia de *Cunninghamella elegans* isolada do sedimento de mangue no município de Rio Formoso-PE-Brasil. O crescimento foi realizado no meio Hesseltine & Anderson, adicionado de diferentes concentrações de NaCl e fontes de carbono. As análises morfológicas foram realizadas acompanhando as alterações na forma e tamanho dos esporângios causadas pelas condições de estresse salino, mesmo na presença das fontes de carbono glicose e sacarose. Observou-se ainda, uma redução no crescimento de *C. elegans* principalmente, com as concentrações de 2,5 e 4,0% de NaCl. As observações ao microscópio de luz demonstraram alterações nos esporângios, verificando-se que na concentração 1,0% de NaCl, o número de esporângios elipsóides aumentou de 10%. Nas concentrações de 2,5 e 4,0% de NaCl os esporângios globosos sofreram uma discreta redução de 68% para 44%, enquanto que os elipsóides aumentaram de 5% para 10 e 11%, respectivamente. E ainda, nas condições 2,5 e 4% de NaCl observou-se a presença de clamidósporos e pequenas ramificações do micélio. Os resultados contribuíram para um melhor conhecimento dos fenômenos microbiológicos decorrentes do estresse pela salinidade, em fungo de manguezal.

Palavras-Chave: *Cunninghamella elegans*, morfologia, salinidade, glicose e sacarose

INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo de organismos cosmopolitas que podem ser encontrados em diversos ambientes em condições favoráveis ou não a sua sobrevivência. São eucarióticos, simbiontes, parasitas e/ou sapróbios e reproduzem-se por meio de esporos de origem assexual ou sexual. Estes microrganismos podem apresentar-se morfológicamente com hifas septadas ou cenocíticas (com raros septos delimitando as estruturas de reprodução) e sua parede celular caracteriza-se por possuir quitina, um polissacarídeo encontrado na maioria dos fungos [2,14, 31].

Dentre os fungos atuantes como biorremediadores de ambientes poluídos, destacam-se os da Ordem Mucorales (Zygomycetes), que compreendem microrganismos com um rápido crescimento em condições de cultivo, considerados patógenos oportunistas para o homem e animais [1].

A adaptação dos fungos às condições de estresse ambiental é um processo biológico importante. Muitos estudos têm citado essa adaptação em ambientes salinos [6, 9, 20]. Entretanto, o crescimento e a produção de esporos podem ser influenciados por esses ambientes salinos [34].

É fundamental o conhecimento do comportamento dos fungos em situações de estresse ambiental, já que nessas condições, diversos microrganismos produzem metabólicos secundários de considerável valor biotecnológico [19, 24, 33].

Esse trabalho tem como objetivos obter o perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* e avaliar o comportamento morfológico em meio contendo diferentes concentrações de NaCl, de glicose e de sacarose.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo - A pesquisa foi realizada com *Cunninghamella elegans* Lendner isolado do sedimento de mangues no Município de Rio Formoso-PE, depositada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP [11], catalogada sob o número 542 e mantida em meio BDA (BIOLIFE®).

Curva de crescimento - A curva de crescimento de *C. elegans* (UCP 542) foi desenvolvida a partir do inóculo 10^7 esporangíolos/mL obtidos do meio de esporulação Yeast Malt Agar-YMA, transferidos para Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50 mL do meio de Hesseltine e Anderson [14], com diferentes concentrações de glicose (2, 4, 6%) e sacarose (2, 4%). Os frascos foram incubados à 30° C durante 96 horas sob agitação orbital de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas a cada 12 horas nas primeiras 48 horas e posteriormente, com intervalos de 24 horas até 96 horas. As culturas foram filtradas (filtro nylon silkscreen 120F) e, posteriormente, a biomassa foi colocada em frascos previamente tarados, submetida ao processo de liofilização mantida em dessecador a vácuo, à temperatura ambiente. A curva de crescimento foi determinada por gravimetria. Os líquidos metabólicos foram submetidos à determinação do consumo de glicose.

Determinação do Consumo de Glicose e Sacarose - O consumo de glicose e sacarose foi realizado com alíquotas retiradas e submetidas ao método enzimático colorimétrico (Lab-Test) determinado por leitura em absorvância de 510 nm [13].

Avaliação do crescimento e morfologia de *C. elegans* - As colônias crescidas no meio de Hesseltine e Anderson [14] adicionado cloreto de sódio (1, 2,5 e 4%), glicose (1, 2,5, 4g/L) e de sacarose (1, 1,5 e 2g/L), de acordo com o planejamento fatorial de 2^3 , foram incubadas a temperatura de 30° C. As placas foram observadas com o auxílio de uma lupa para análise da morfologia, em relação ao aspecto macroscópico, levando-se em consideração a coloração e aspecto geral das colônias. Para a observação dos aspectos microscópicos das alterações morfológicas foi feita cultura em lâmina em quatro dias, coradas com azul de Amann, sendo observados através de microscopia de luz forma dos esporangiólos, esporângios e a presença de estruturas de resistência. Os esporangiólos foram observados em microscópio ótico com aumento de 400X e contados utilizando-se uma suspensão de 10^7 , tendo sido avaliados um total de 200 esporangiólos para cada concentração de salinidade.

Planejamento Fatorial - Um planejamento fatorial completo 2^3 com 8 ensaios e 4 repetições no ponto central, foi realizado, com o objetivo de avaliar o efeito das concentrações de glicose, cloreto de sódio e sacarose. A Tabela 1 mostra os valores das variáveis +1, -1 e ponto central.

Influência da salinidade no crescimento de *C. elegans* de acordo com a Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 - O crescimento de *C. elegans* (UCP 542) foi desenvolvido a partir do inóculo 10^7 esporangiólos/mL obtidos do meio de esporulação

Yeast Malt Agar-YMA, transferidos para Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 25 mL do meio Yeast Malt Broth - YMB. Os frascos foram incubados à 30°C durante 48 horas sob agitação orbital de 150 rpm. A biomassa crescida por 48h foi transferida para Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 25 mL do meio Hesseltine e Anderson [14] e mantida em agitação constante por 48 horas, servindo de pré-inóculo nos experimentos subsequentes. Após esse período, toda a biomassa foi transferida para Erlenmeyers de 1000 mL contendo 300 mL do meio Hesseltine e Anderson [14], de acordo com planejamento fatorial de 2³. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 72 horas. Após esse período, a biomassa foi obtida por filtração utilizando filtro de nylon silkscreen 120F. Em seguida, a biomassa foi transferida para frascos previamente tarados, submetida ao processo de liofilização e mantida em dessecador à vácuo, à temperatura ambiente. A biomassa foi determinada por gravimetria. Os líquidos metabólicos foram submetidos à determinação do consumo de carboidratos totais e pH.

Determinação do pH - O acompanhamento do pH do líquido metabólico dos distintos ensaios foi determinado por potenciometria (Potenciômetro digital Quimis Mod.400 A).

Determinação do Consumo de Carboidratos Totais - O consumo de carboidratos totais foi determinado pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. [8]. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital (Spectronic Mod. Genesys 2) no comprimento de onda de 490nm, utilizando glicose como padrão.

Tratamentos estatísticos - a influência das várias concentrações de NaCl, em associação com glicose e sacarose na morfologia dos esporângios de *C. elegans* foi utilizada análise de variância de Kruskal-Wallis [29]. A influência de glicose e da sacarose sobre o estresse causado pela salinidade no crescimento e na morfologia dos esporângios de *C. elegans* foi avaliado utilizando-se uma análise de variância binomial (ANOVA), de acordo com Ayres et al. [4].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da glicose no crescimento de *C. elegans*

O perfil de crescimento de *C. elegans* está apresentado nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 utilizando a determinação do consumo de glicose (2, 4 e 6%) e sacarose (2, 4%), produção da biomassa e determinação do pH no decorrer das 96 horas de fermentação. Na Figura 2 observa-se maior produção de biomassa (5,77g/L), com 96 horas na curva de crescimento com glicose a 2%.

Rast et al. [25] durante seus estudos utilizando amostra de *Mucor rouxii* demonstraram rendimentos em torno de 9,0 a 14,0 g/L, apresentando resultados muito superiores aos aqui obtidos. Utilizando o mesmo microrganismo, Synowieck e Al-Khateeb [31] encontraram valores em torno de 4,0 g/L após 48 horas de crescimento. Porém, Leão et al. [16], obtiveram um peso seco de biomassa máximo de 0,05 g/L com *Halophytophthora vesicula* durante 48 horas, resultando em valor inferior ao encontrado neste trabalho.

Outro trabalho foi desenvolvido por Andrade et al. [3] utilizando *C. elegans* apresentando resultados em torno de 10,0 a 14,0 g/L após 96 horas de cultivo, cujos rendimentos foram superiores aos resultados obtidos nesta pesquisa. O comportamento do

pH no decorrer do período de 96 horas de cultivo demonstrou discreta oscilação apresentando valores entre de 4,0 e 5,0, concordando com os resultados obtidos por Franco (10).

O crescimento de *C. elegans* em meio de cultura com diferentes valores de pH está representado na Tabela 2. Observou-se que o pH variou de 4,0 a 7,0, conforme os dados descritos por Leão [16]. O crescimento micelial somente foi possível com pH variando entre 6,0 a 8,0, no entanto Franco [10], descreve valores que oscilaram entre 4,0 a 5,0, para o maior conteúdo de biomassa.

Influência da salinidade associada às fontes de carbono glicose e sacarose no crescimento de *C. elegans*

O crescimento de *C. elegans* em meios de cultura com diferentes concentrações de NaCl, associado à glicose e sacarose após 96 horas de fermentação, está apresentado na Tabela 2. Na presença de NaCl a 1 %, os valores da biomassa são 4,67 g/L e 4,12 g/L nas condições 2 e 4, respectivamente. Nessas condições, a concentração da glicose é superior a da sacarose mostrando a importância da glicose para o crescimento do fungo. Em relação ao NaCl a 4%, as melhores condições de crescimento continuam sendo aquelas que apresentam uma concentração de glicose superior a da sacarose cujos valores são: 4,42 g/L e 4,68g/L (condição 6 e 8, respectivamente). Porém o mais alto valor de crescimento micelial foi o da condição 9, apresentando 5,10 g/L. A figura 6 mostra que em todas as condições estudadas, mesmo ocorrendo maior concentração de sal a glicose foi consumida satisfatoriamente. Supõe-se que as células mantiveram o consumo para garantir a sua sobrevivência.

Estudos com leveduras e com altas concentrações de NaCl sugerem resultados bem diferentes destes aqui descritos. Prapailong e Fleet [23] estudaram 30 leveduras de

alimentos apodrecidos em meio contendo 7,0 a 20,0% de NaCl e 12,0 e 45% de sacarose. Nove ensaios cresceram a 20,0% de NaCl e os menos tolerantes cresceram na faixa de 7,5 a 10%. Em relação à fonte de carbono todas as espécies cresceram na presença de sacarose, semelhantes aos resultados aqui obtidos. Llorente et al [17], pesquisaram o efeito do NaCl em leveduras e mostraram um retardo no crescimento em todas as amostras testadas na presença de NaCl entre 6 a 15%. O crescimento de uma levedura halofílica mutante em meio contendo 2% de glicose e 3-12% de NaCl foi avaliado por Yoshikawa et al [35], observando que, o melhor meio para crescimento foi verificado com 6,0 a 12% de NaCl.

Estudos feitos por Marshall et al [18] analisaram a influência de 1,0 a 10% de NaCl no crescimento e na sobrevivência de *Propionibacterium freudenreichii*, *Bacillus pumilus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Apenas *S. cerevisiae* sofreu um retardo no seu crescimento na presença de 2,0 a 10,0% de NaCl, semelhante aos estudos de Llorente et al [17].

Sterflinger e Krumbein [30] estudaram fungos dematiáceos em meio contendo concentrações de NaCl a 2,0, 3,5 e 7,0%, todos apresentaram crescimento nesta faixa de salinidade, mostrando a sua holotolerância, similar aos resultados obtidos neste trabalho.

Efeitos da salinidade no crescimento e na morfologia de *C. elegans* na presença das fontes de carbono glicose e sacarose

As colônias foram analisadas macroscopicamente durante 3 dias. As colônias de *C. elegans* apresentaram um micélio aéreo branco inicialmente e posteriormente, acinzentado, com ausência das zonas de crescimento, sendo esses resultados semelhantes a Baijal e Mehotra [5] e Santiago [27].

A presença de clamidósporos nos micélios de *C. elegans* crescida nos meios com salinidades de 2,5 e 4,0%, sugere como uma resposta do fungo ao estresse salino. Esse

fenômeno de resistência à salinidade está relacionado com o seu habitat em sedimento de mangue, ambiente onde existe uma considerável variação salina.

As colônias de *C. elegans* observadas ao microscópio de luz e representadas nas Figuras 7 e 8, exibiram alterações nos esporângios nas concentrações de 2,5 e 4,0% de NaCl. Verificou-se que no meio controle (Figura 7A), o micélio apresentou-se bastante ramificado sem clamidosporos e com 68% de esporângios globosos superando os 5% de esporângios elipsóides, na concentração de 1,0% de NaCl o número de esporângios elipsóides subiu para 10% e nas concentrações de 2,5 e 4,0% NaCl observou-se que os esporângios globosos sofreram um discreto decréscimo para 44% e os elipsóides para 10 e 11%, respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 9 mostraram que o aumento da salinidade dos meios de cultura foi acompanhado por modificações na forma dos esporângios. A quantidade de globosos diminuiu, porém houve uma pequena elevação dos subglobosos, subglobosos para elipsóides e elipsóides. A produção de esporângios na maioria globosa e minoria elipsóide foram também observadas por Shipton e Lunn [28] e Santiago [27], concordando com os resultados aqui obtidos.

Sugere-se ainda, que o aumento de NaCl nos meios de cultura, tenha a função de induzir alterações morfológicas que podem estar relacionadas à disfunções associadas aos mecanismos controladores da permeabilidade celular, fazendo com que sejam produzidas células morfológicamente diferentes.

Por outro lado, a inibição observada no crescimento de *C. elegans* são apoiadas por Prista et al [22] pesquisaram sobre o transporte intracelular do Na⁺ de *Debaryomyces hansenii*, e Rodrigues e Sant'Anna [26] usando *Saccharomyces cerevisiae* demonstrando a influência do NaCl no crescimento micelial e na produção de proteínas extracelulares

totais em função do deslocamento de aminoácidos do meio intracelular para o meio extracelular.

Outros estudos com *S. cerevisiae*, Ölz et al [20] investigaram o desenvolvimento celular mediante estresse salino de 0 a 0,9M NaCl. Os resultados revelaram que a presença do NaCl inibiu o crescimento das células em 25%, quando comparado ao controle.. Resultados semelhantes foram observados por Gustafsson e Larsson [12] avaliando o crescimento de *S. cerevisiae* na presença de 0,7M NaCl, confirmando os resultados obtidos com *C. elegans*.

Ali [2], observou crescimento apenas vegetativo em *Saprolegnia parasitica* na presença de determinadas concentrações de NaCl e ácido ascórbico. O NaCl e o ácido ascórbico combinados melhoram a tolerância de *S. parasitica* ao sal. A formação dos esporângios e a sua liberação foram sensíveis até nas baixas taxas de salinidade.

Christian e Waltho [7]; Tempest et al.[31]; Rodrigues e Sant'Anna [26], supõem que a redução do crescimento celular pela presença de NaCl no meio, esteja ligada diretamente a saída da água para o meio externo devido a pressão osmótica desempenhada pelo NaCl, contudo, essa perda de água pelas células para o meio mais concentrado, causa um aumento na quantidade de aminoácidos intracelulares [26]. As informações da literatura além de apoiar os resultados obtidos com *C. elegans* permitem esclarecer parte dos fenômenos biológicos que ocorrem com o efeito do estresse salino.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FACEPE e FINEP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alexopoulos, C. J.; Mims, C.W.; Blackwell. Introductory Mycology. John Wiley and Sons. *New York*. 868p. 1996.
- [2] Ali E.H.; Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. *Mycopathologia*, 159 (2): 231-243. 2005.
- [3] Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki G.M. A Factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microbiol.*, 46: 1042-1045. 2000.
- [4] Ayres, M.; Ayres, Jr.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. Biostat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. *Sociedade Civil Mamiraua*. Manaus. 1998. 193p.
- [5] Baijal, U.; Mehrotra, B.S. The genus *Cunninghamella* – reassessment. *Sydowia*. 33: 1-13. 1980.
- [6] Beever, R.E; Laracy, E.P. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bact.*, 168: 1358-1365. 1986.
- [7] Christian, J.H.B.; Waltho, J.A. The composition of *Staphilococcus aureus* in relation to the water activity of the growth médium. *Journal of Genetic Microbiology*. 35: 205-213. 1964.
- [8] DuBois, K.P.; Murphy, S.D. Thursh DR. *Arch. industr. Hlth.*, 13, 606. 1956.

- [9] Edgley, M.; Brown, A.D. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3453-3463. 1983.
- [10] Franco, L.O. Biorremocão de metais pesados por quitina e quitosana obtidas de *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2000.
- [11] Gomes, P.F.; Nascimento, A.E.; Okada, K.; Messias, A.S.; Sharia, A.E.N.; Campos-Takaki, G.M. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challengens and propects. 2000. 82.
- [12] Gustafsson L.; Larsson, C. Energy budgeting in metabolism of yeasts. *Thermochim. Acta*, 172:95-104. 1990.
- [13] Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J. W. Clinical Chemistry, Principles and Technics 2nd Ed. *New York, Harper and Row*, 1974.
- [14] Hesseltine, C.W.; Anderson, R.F. Microbiological production of carotenoids. *Mycologia*. 49: 449-452. 1957.
- [15] Knorr, D.; Beaumont, M.D.; Pandya, Y. Potencial of acid soluble and water-soluble chitosan in biotechnology. In Chitin and chitosan. Edited by G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford. *Elservier: London, N.Y.* 101-118p. 1989.
- [16] Leño, E.M.; Vrijmoed, L.L.P.; Jones, E.B.G. Physiologiocal Studies on *Halophytophthora vesicula* (Strminipilous Fungi) Isolated from Fellen Mangrove Leaves from Mai Po, Hong Kong. *Botanica Marina*. 41: 411-419. 1998.

- [17] Llorente, P.; Marquina, D.; Santos, A.; Peinado, J.M.; Martins-Spencer I. Effect of Salt on the Killer Phenotype of Yeasts from Olive Brines. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(3): 1165-1167. 1997.
- [18] Marshall, D. L.; Odame-Darkwah, K. Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Bacillus pumilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Lebensm.-Wiss.u.- Technol.*, 28: 222-226. 1995.
- [19] Martines-Force, E.; Benitez, T. Changes in yeast amino acids pool with respiratory versus fermentative metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. New York. 40: 643-649. 1992.
- [20] Ölz, R.; Larsson, K.; Adler, L.; Gustapsson, L. Energy Flux and Osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* Growth in Chemostats under NaCl Stress. *Journal Bacteriology*. 2205-2213. 1993.
- [21] Park, J.C.; Nemoto, Y.; Homma, T.; Jing, W.; Chen, Y.; Matsuoka, H.; Ohno, H.; Takatori, K.; Kurata, H. Adaptation to *Aspergillus niger* to Short-term salt stress. *Applied. Microbiol. Biotechnol.* 40: 394-398. 1993.
- [22] Prista, C.; Soeiro, A.; Vesely, P.; Almagro, A.; Ramos, J.; Loureiro-Dias, M.C. Genes from *Debaryomyces hansenii* increase salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. *FEMS Yeast Research*. 2:151-157. 2002.
- [23] Prapailong, W. Fleet G.H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*. 14: 459-468. 1997.

- [24] Radwan, S.S.; El-Essawy, A.A.; Helal, G.A. Salinity-loving fungi in Egyptian soils Numbers, identities, and halophilism. *Zbl. Mikrobiol.* 139: 435-440. 1984.
- [25] Rast, D.M.; Horsh, M.; Furter, R.; Gooday, G.W. A complex chitnolytic systems in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*. Properties and function. *J. General Microbiol.* 137: 2797-2810. 1991.
- [26] Rodrigues, A.M.; Sant' Anna, E.S. Efeito do Cloreto de Sódio na Produção de Proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em Fermentação Semi-Sólida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 21(1): 57-62. 2001.
- [27] Santiago, A.L.C.M. Efeitos da salinidade e da temperatura na germinação no crescimento radial e na morfologia de *Cunninghamella elegans* Lendner. *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2004.
- [28] Shipton, W.A.; Lunn, J.A. Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 74(3): 483-491. 1980.
- [29] Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. Biometry. *Freeman & Company*, New York, 598p. 1995.
- [30] Sterflinger, K.; Krumbein, W.E. Multiple stress factors affecting growth of rock-inhabiting black fungi. *Bot. Acta.* 108:490-496. 1995.
- [31] Synowiecky, J.; Al-Khateeb, N.A.A.Q. Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. *F. Chem.* 60: 435-440. 1997.
- [32] Tempest, D.W.; Meers, J.L.; Brown, C.M. Influence of environment on the free amino acid pool. *Journal of Genetic Microbiology.* 64: 171-185. 1970.
- [33] Torzilli, K. Studies on the japanese marine fungi lignicolous group (111), algicolous group and a general consideration. *Annual Report, Institute for Fermentation, Osaka.* 1997.

[34] Unemoto, S.; Irie, Y.; Imai, T. The effect of electrolytes concentration on alcoholic fermentation of molasses. I. Glycerol accumulation in the médium caused by high concentrations of electrolytes. *Journal of Fermentation Technology. Osaka*, 45: 117-124. 1967.

[35] Yoshikawa, S.; Togawa, Y.; Mitsui, N.; Chikara, K.; Taguchi, G.; Shimosaka, M.; Okazaki, M. A temperatura-sensitive osmophilic mutant of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biotechnology Letters*. 18: 655-658. 1996.

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3

NÍVEL	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	NaCl (%)
1	1	1	1
2	4	1	1
3	1	2	1
4	4	2	1
5	1	1	4
6	4	1	4
7	1	2	4
8	4	2	4
9	2,5	1,5	2,5
10	2,5	1,5	2,5
11	2,5	1,5	2,5
12	2,5	1,5	2,5

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: Glicose, 1,0g/L (-1) e 4,0g/L (+1); Sacarose, 1,0 g/L (-1) e 2,0 g/L (+1); NaCl, 1,0% (-1) e 4,0% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: Glicose, 2,5 g/L; Sacarose, 1,5g/L; NaCl 2,5%.

Tabela 2: Valores de pH, NaCl, biomassa e carboidratos totais após 72 horas de incubação a 30°C, seguindo as diferentes concentrações indicadas no planejamento fatorial.

Condições	pH (inicial)	pH (final)	Salinidade(‰) (inicial)	Salinidade(‰) (final)	Biomassa(g/L)
1	5,3	7,1	6,0	4,5	3,22
2	5,3	7,2	7,0	4,5	4,67
3	5,3	4,0	6,0	5,5	3,40
4	5,3	4,0	9,0	8,0	4,12
5	5,3	3,9	10,0	7,0	3,42
6	5,3	4,2	10,0	6,0	4,42
7	5,3	6,6	10,0	6,0	3,92
8	5,3	6,6	11,0	6,0	4,68
9	5,3	6,9	9,0	5,0	5,10
10	5,3	6,8	9,0	5,0	4,99
11	5,3	6,5	9,0	5,0	4,87
12	5,3	6,9	9,0	5,0	5,00

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: Glicose, 1,0g/L (-1) e 4,0g/L (+1); Sacarose, 1,0 g/L (-1) e 2,0 g/L (+1); NaCl, 1,0% (-1) e 4,0% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: Glicose, 2,5 g/L; Sacarose, 1,5g/L; NaCl 2,5%.

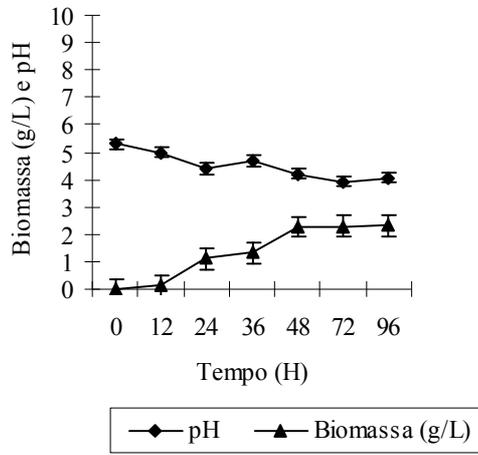


Figura 1: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo glicose a 2% descrito por Hesseltine e Anderson [14].

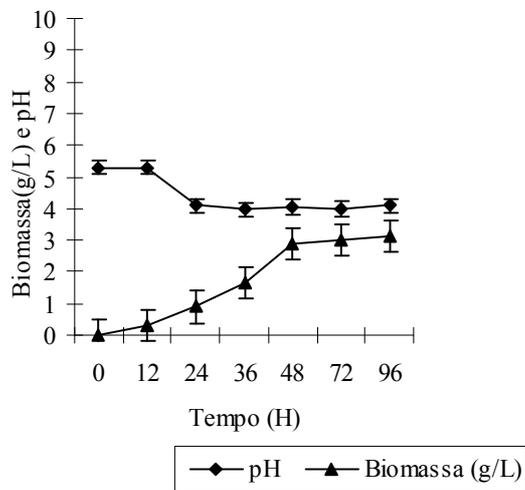


Figura 2: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo glicose a 4% descrito por Hesseltine e Anderson [14].

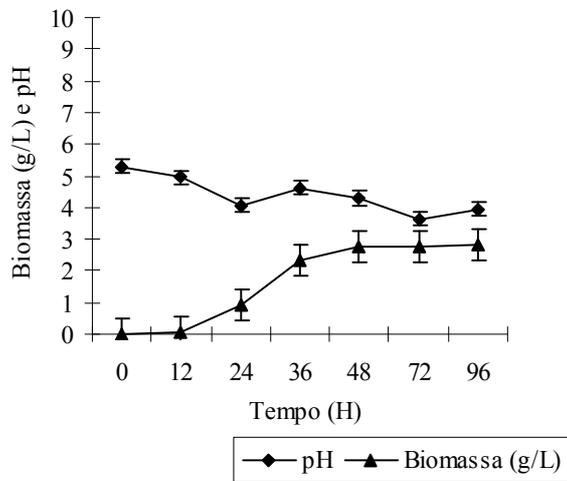


Figura 3: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo glicose a 6% descrito por Hesseltine e Anderson [14].

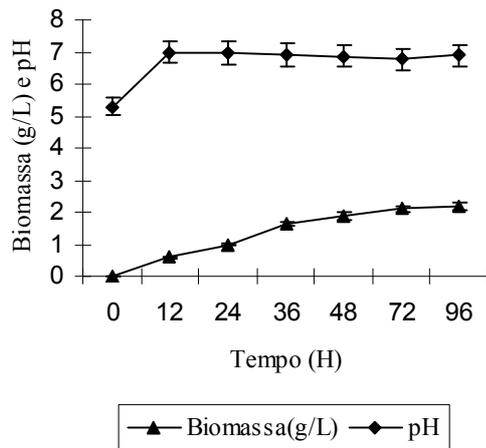


Figura 4: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo sacarose a 2% descrito por Hesseltine e Anderson [14].

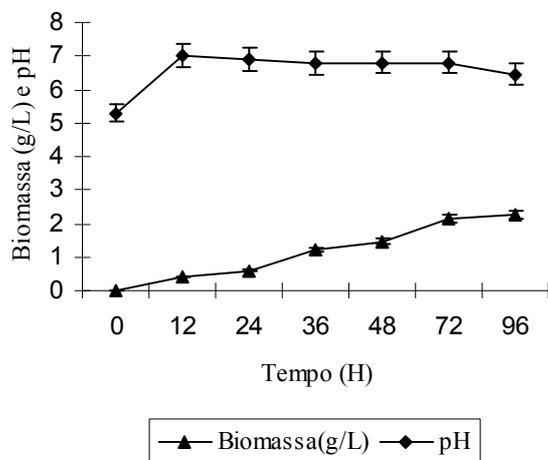


Figura 5: Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio contendo sacarose a 4% descrito por Hesseltine e Anderson [14].

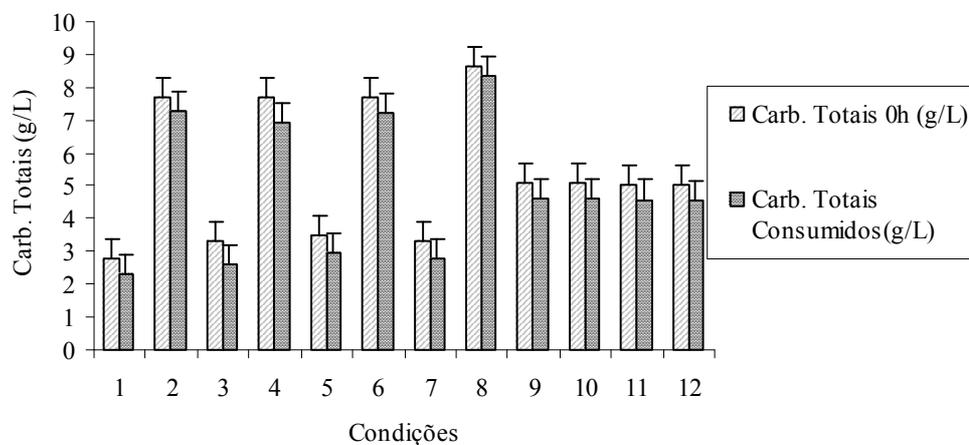


Figura 6: Carboidratos Totais no líquido metabólico de *C. elegans* (UCP 542) cultivada em meio Hesseltine e Anderson [14] adicionado de diferentes concentrações de NaCl, glicose e sacarose, de acordo com o planejamento fatorial.

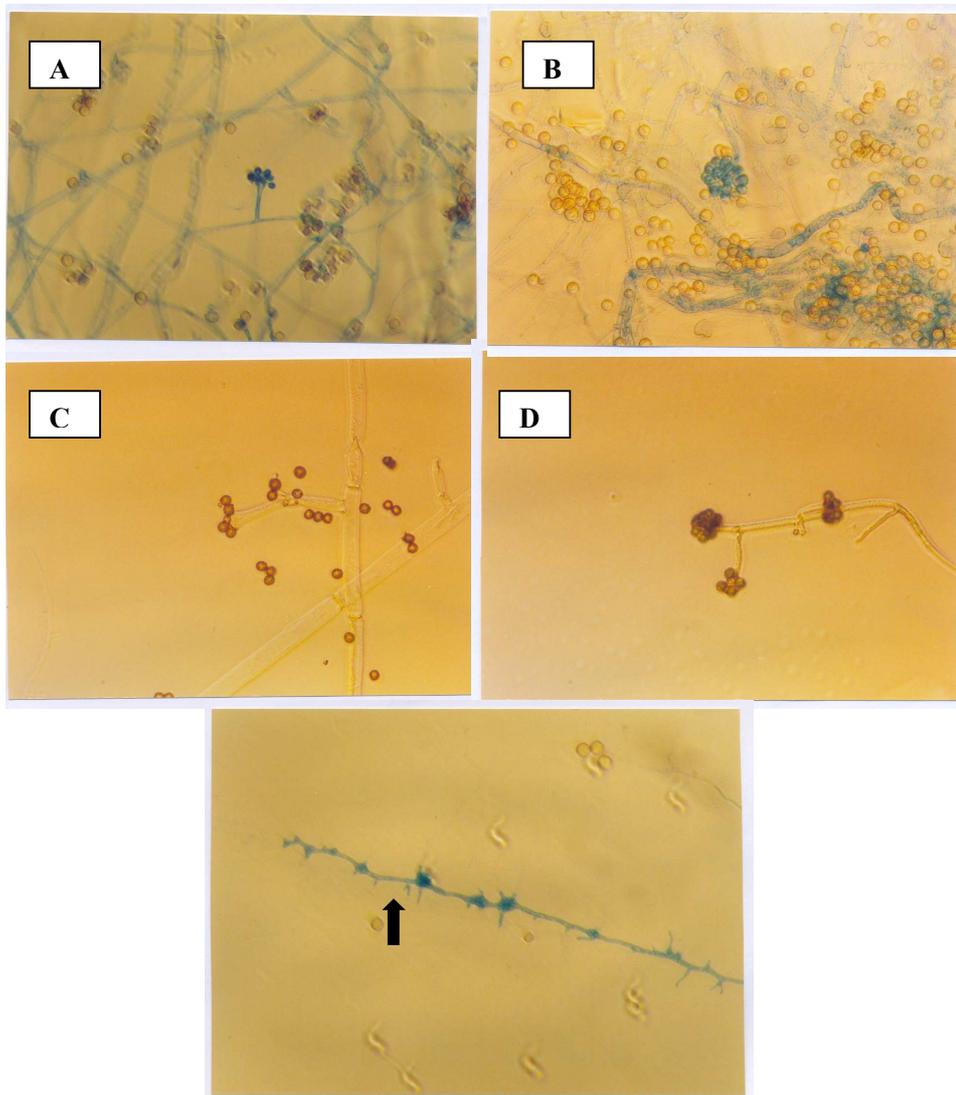


Figura 7: Variações morfológicas de *C. elegans*: **A.** Meio H&A controle; **B.** Condição 1 (Glicose 1,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 1,0 %); **C.** Condição 2 (Glicose 4,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 1,0 %); **D.** Condição 3 (Glicose 1,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 1,0 %); Formação de clamidósporos: **E.** Condição 4 (Glicose 4,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 1,0 %) (400X).

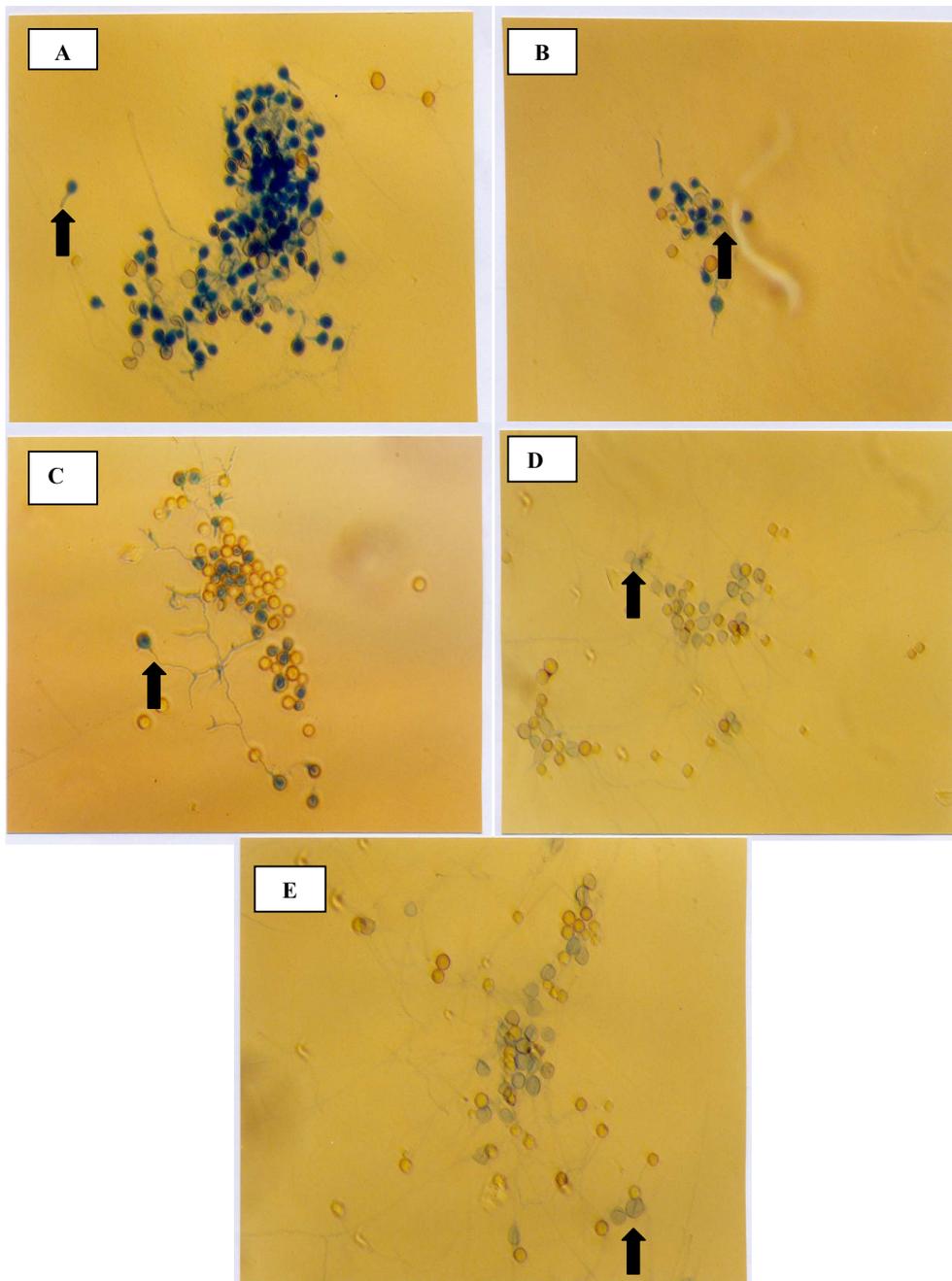


Figura 8: Variações morfológicas de *C. elegans*. Formação de clamidósporos: **A.** Glicose 1,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 4,0 %; **B.** Glicose 4,0 g/L, Sacarose 1,0 g/L, NaCl 4,0 %; **C.** Glicose 1,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 4,0 %; Columelas Dilatadas: **D.** Glicose 4,0 g/L, Sacarose 2,0 g/L, NaCl 4,0 %; **E.** Glicose 2,5 g/L, Sacarose 1,5 g/L, NaCl 2,5 % (400X).

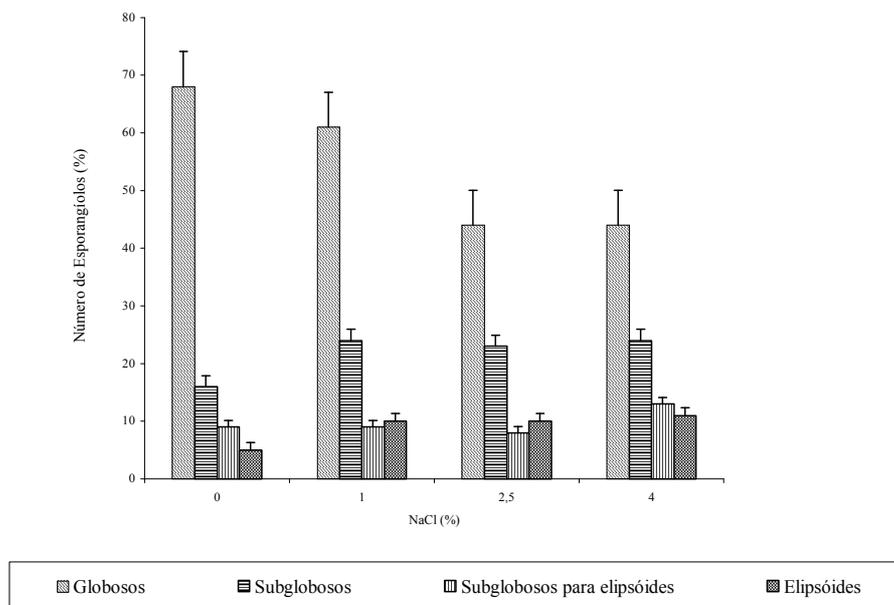


Figura 9: Variações morfológicas dos esporangios de *C. elegans* (UCP 542), em meio Hesseltine e Anderson [14] controle e modificado pelas médias das condições de acordo com o planejamento fatorial.

Segundo Artigo

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE E DE FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA POR *Cunninghamella elegans* UCP 542

Manuscrito a ser submetido para publicação no:

Journal Microbiology and Biotechnology

**INFLUÊNCIA DA SALINIDADE E DE FONTES DE CARBONO NA
PRODUÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA POR
Cunninghamella elegans UCP 542**

MARTA CRISTINA DE FREITAS DA SILVA

Mestrado em Biologia de Fungos,
Universidade Federal de Pernambuco,
Cidade Universitária, 50 670-901 Recife, PE, Brazil

THAYZA CHRISTINA MONTENEGRO STAMFORD

Doutorado em Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco,
Cidade Universitária, 50 670-901 Recife, PE, Brazil

BENICÍO DE BARROS NETO

Departamento de Química Fundamental,
Av. Professor Moraes Rego s/n,
Cidade Universitária, 50 670-901 Recife, PE, Brazil

GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI*

Departamento de Química
Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais
Universidade Católica de Pernambuco
Boa Vista. 50 050-590 Recife, PE, Brazil.
Tel.: +55-81-32164017 Fax: +55-81-32164043.
E-mail: takaki@unicap.br

*Corresponding author: **GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI***

Departamento de Química, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Boa Vista. 50 050-590 Recife, PE, Brazil

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP).

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo verificar a influência do NaCl e das fontes de carbono na produção de quitina e quitosana por *Cunninghamella elegans* (UCP 542). A produção de quitina e quitosana foi avaliada utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 , com 4 pontos centrais para analisar os efeitos principais e as interações das variáveis: concentração de glicose, de sacarose e de cloreto de sódio. O crescimento do fungo foi realizado durante 96 horas sob agitação (125rpm) a 28°C, usando o meio descrito por Hesseltine & Anderson (1957), adicionado de NaCl, glicose e sacarose, segundo condições descritas no planejamento fatorial. A biomassa produzida ao final do cultivo após liofilização, foi submetida ao processo de extração de quitina e quitosana utilizando-se tratamento alcali-ácido. Os polissacarídeos foram caracterizados através de Espectroscopia ao raio de Infravermelho. O melhor rendimento de quitosana (18,3%) foi obtido na condição 8 (2g/L sacarose, 4g/L glicose e 4% NaCl), enquanto que o de quitina (41,5%) na condição 2 (1g/L sacarose, 4g/L glicose e 1% NaCl). A produção de quitina foi influenciada negativamente pela concentração de sacarose, glicose e NaCl no meio de cultura, porém, o efeito de interação entre estes fatores apresentou influencia positiva. Por outro lado, a produção de quitosana foi influenciada positivamente pela presença de glicose e concentração de NaCl contudo, a sacarose não apresentou influência. Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de uso de NaCl e glicose como um método adequado para o aumento da produção de quitina e quitosana.

Palavra-Chave: *Cunninghamella*, glicose, quitina, quitosana, sacarose e salinidade

ABSTRACT

The present study has as objective to verify the influence of the NaCl and the carbon sources in the chitin and chitosan production by *Cunninghamella. elegans* (CPU 542). The production of chitin and chitosan was evaluated using an factorial design 2^3 , with 4 central points to analyze the main effect and the interactions of the variable: concentration of glucose, sucrose and sodium chloride. The growth of fungi was carried out during 96 hours under agitation (125rpm) 28°C, using the method described by Hesseltine & Anderson (1957), added of NaCl, glucose and sucrose, according to described conditions in the factorial design. The biomass produced to the end of the culture after liophylization, was submitted to the process of extraction of chitin and chitosan using itself alkali-acid treatment. The polysaccharides had been characterized through spectroscopy to the Infra-red ray. The best income of chitosan (18,3%) was obtained in condition 8 (2g/L sucrose, 4g/L glucose and 4% NaCl), while that of chitin (41,5%) in condition 2 (1g/L sucrose, 4g/L glucose and 1% NaCl). The chitin production was influenced negative by the concentration of sucrose, glucose and NaCl in the culture, however, the effect of interaction between these factors presented positive influences. On the other hand, the chitosan production was influenced positively by the presence of glucose and concentration of NaCl. However, sucrose did not present influence. The results obtained demonstrate to the possibility of use of NaCl and glucose as a method adjusted for the increase of the chitin production and chitosan.

Key- Words: *Cunninghamella*, glucose, chitin, chitosan, sucrose e salinity

Os fungos consistem em um grupo de organismos com um grande interesse prático e científico (Wang et al. 2000). Os comportamentos dos fungos em situações de estresse ambiental, vem sendo amplamente estudados, uma vez que muitos microrganismos, nessas situações, produzem metabólitos secundários de importante valor biotecnológico (Radwan et al. 1984; Torzilli, 1997).

O crescimento dos fungos é sensível a uma grande variedade de condições ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes, temperatura (Weits et al., 2001; Loureiro et al., 2002; Plaza et al., 2003), condições de umidade e salinidade (Tekere et al., 2001; Diaz et al., 2002). Todavia, alguns podem crescer bem em ambiente salino, como água do mar e salmoura de industria de conservantes (Edgley e Brown, 1980). Estudos têm mostrado a adaptação de fungos em condições de tensão ambiental, inclusive os efeitos das fontes de carbono e salinidade (Edgley e Brown, 1980; Jonathan e Fasidi, 2003).

Em estudos morfológicos e fisiológicos com fungos, vários autores relatam alterações no crescimento das colônias e na forma dos esporos, assim como aumento da tolerância à salinidade com a elevação da temperatura de cultivo (Castilo e Demoulin, 1997; Edwards et al., 1998; Cimerman et al., 2000). A presença de altas concentrações de NaCl no meio altera a pressão osmótica da célula microbiana, influenciando de forma sensível o metabolismo e a produção de biomassa (Mert e Dizbay, 1997; Rodrigues e Santana, 2001; Santos et al 2001; Lenartovicz et al., 2003).

Recentes avanços em tecnologias de fermentação sugerem que o cultivo de fungos selecionados possa prover uma fonte alternativa de quitina e quitosana (Andrade et al. 2003; Nadarajah et al. 2001; Pochanavanich e Suntomsuk, 2002). As quantidades desses polissacarídeos dependem das espécies de fungos e condições de cultivo. Normalmente, os Zygomycetes têm quantidades mais altas de quitina e quitosana em suas paredes celulares, quando comparada a outras classes de fungos (Andrade et al. 2000; Campos-Takaki, 2005; Franco et al. 2005).

Várias pesquisas utilizando fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana relatam rendimentos iguais ou superiores, destes polímeros, aos obtido quando utilizadas fontes tradicionais (Synowiecki e Al-khateeb, 1997; Nadarajah et al. 2001; Pochanavanich e Suntomsuk, 2002). Em recentes estudos, tem se estabelecido métodos de otimização para processos de obtenção de quitina e quitosana a partir de massa micelial de *Cunninghamella*

elegans, sendo relatados rendimentos de quitosana entre 5 e 8%, e de quitina em torno de 13 a 24% (Andrade et al., 2000, Amorim et al., 2001; Andrade et al., 2003; Franco et al., 2005).

A quitina é um polímero natural, insolúvel em água, linear que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4 N-acetilglucosamina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante (depois de celulose). Encontra-se no exoesqueleto de crustáceo, cutícula de insetos e parede celular de alguns fungos (Andrade et al. 2003; Synowiecki e Al-Khatteb, 2003; Franco et al. 2005). A quitosana é um polissacarídeo amino catiônico, essencialmente composto de ligações β -1,4 D-glucosamina (GlcNAc) unido a resíduos de N-acetil-D-glucosamina (Andrade et al. 2000; Campos-Takaki, 2005), e deriva-se da N-deacetilação da quitina (Tharanathan e Kittur, 2003; Amorim et al, 2005).

A quitina e quitosana possuem um grande valor econômico devido às suas atividades biológicas versáteis e aplicações, principalmente médicas (Synowiecki e Al-Khatteb, 2003; Murugan e Ramakrishna, 2004; Yadav e Bhise, 2004) e farmacêuticas (Takeuchi et al. 2001; Kato et al. 2003). O grande número de aplicações destes polímeros foi estudado extensivamente (Yadav e Bhise, 2004; Campos-Takaki, 2005). Quitina e quitosana mostram propriedades como: biodegradação, biocompatibilidade, bioação, permeabilidade seletiva, ação de polieletrólitos, propriedades de troca iônica, antitumoral e atividade antimicrobiana (Santos et al. 2003; Chung et al. 2004; Yadav e Bhise, 2004), e capacidade de adsorção (Shigemasa e Minami, 1996; Tharanathan e Kittur, 2003; Franco et al. 2004).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência do estresse salino, na presença de sacarose e glicose, na produção de quitina e quitosana por *C. elegans* (UCP 542). Neste sentido, na metodologia foi investigada a influência do efeito destes fatores e a interação entre os mesmos utilizando um planejamento fatorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo

Cunninghamella elegans (UCP 542) foi isolada do sedimento de mangue do Município de Rio Formoso, Brasil, catalogada e depositada no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB- Universidade Católica de Pernambuco –

UNICAP (Gomes et al., 2000). A linhagem foi mantida em meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) a 5°C.

Condições de cultivo

Os esporângios de *C. elegans* cresceram durante sete dias a 28°C em placas de Petri contendo o meio Yeast Malt Agar (YMA). Utilizando-se uma cultura monospórica de *C. elegans*, foi realizada a padronização de inóculo através de contagem de esporângios em hematocítômetro para uma concentração final de 10^7 esporângios/mL. Cerca de 10mL do inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 100mL do meio de cultura descrito por Hesseltine e Anderson (1957), adicionado de concentrações distintas de sacarose, glicose e NaCl, segundo as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial, seguido de incubação a 28°C, por 48 horas, sob agitação orbital de 150 rpm. Em seguida, após o tempo de incubação os frascos foram transferidos para frascos de 1000 mL, contendo 200 mL do mesmo meio, incubados à temperatura de 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm, durante 72 horas. Ao final do crescimento a biomassa foi coletada por filtração em membrana de fibra sintética de silkscreen (120 F), seguida de duas lavagens com água deionizada, submetida à liofilização e posterior determinação do peso seco.

Métodos Analíticos

Extração de Quitina e Quitosana

O processo de extração da quitina e quitosana foi realizado de acordo com Franco et al, (2004). O processo constou de desproteinização da biomassa pelo tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 2% w/v (30:1 v/w, 90°C, 2 h). Em seguida, separação da fração alcali-insolúvel (AIF), através de centrifugação (5000g, 15 min.), extração da quitosana (AIF) sob refluxo com uma solução a 10% v/v de ácido acético (40:1 v/w, 60°C, 6 h). A separação de quitina foi realizada por centrifugação (5000 g, 15 min.), precipitação da quitosana a pH 9.0, ajustado o pH com uma solução de NaOH a 4 M. Osco-polímeros obtidos quitina e quitosana foram lavados com água destilada, etanol, acetona e secos a temperatura de 20°C.

Caracterização da Quitina e Quitosana

Espectroscopia de Infravermelho

Dois miligramas de amostras de quitina e quitosana que foram secas *overnight* a 60°C sob pressão reduzida foram completamente homogêneas com 100mg de KBr. Os discos de KBr preparados foram secos por 24h a 110°C, sob pressão reduzida. A espectroscopia ao raio infravermelho foi realizada utilizando-se espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS. Discos de KBr foram utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base.

Planejamento Fatorial

Realizou-se um planejamento fatorial 2^3 com 4 pontos centrais para analisar os efeitos principais do estresse salino e interações das variáveis concentração de sacarose e glicose, sobre a produção de quitina e quitosana por *C. elegans* (UCP 542). A Tabela 1 apresenta as variáveis e os níveis estudados no referido planejamento. O erro experimental estimado foi calculado por quatro repetições do ponto central. Os cálculos de todos os testes foram realizados com a ajuda do programa STATISTICA versão 6.0 da Statsoft Inc., USA. e apenas, as relações com p value menor ou igual a 0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta os rendimentos de quitina e quitosana extraídas do micélio de *C. elegans* (UCP 542) nas diferentes condições de cultivo, estabelecidas pelo planejamento fatorial.

Os melhores rendimentos, valores percentuais médios, da produção de quitina e quitosana foram obtidos na presença de 4% de glicose. A produção de quitina foi acentuada na presença de 1% de sacarose e de 1% de NaCl (Figura 1A), enquanto que a produção de quitosana foi maior com 2% de sacarose e 4% de NaCl (Figura 1B), sendo os rendimentos, respectivamente de 41,5% e de 18,3%.

Esses dados estão de acordo com os resultados de Pochanavanich e Suntornsuk (2002) e Nadarajah et al (2001) que reportam sobre a produção de quitosana por fungos é dependente das condições de cultivo, incluindo as fontes de carbono.

E ainda, Andrade et al. (2000) e Franco et al (2004) propuseram que *C. elegans* como sendo uma promissora fonte de quitina e quitosana. Para Chung et al. (2004) o processo de produção de quitina e quitosana por via microbiológica, demonstra que o conteúdo destes polissacarídeos na parede celular de fungos é geralmente maior em Zygomycetes.

Os resultados de produção da quitina e da quitosana (Figura 1) obtidos neste trabalho, nas condições 2 e 8, respectivamente, são superiores aos descritos por Synowiecki; Al-Khateeb (1997), que obtiveram rendimentos de quitosana a partir da biomassa de *Mucor rouxii*, em torno de 9 % e 7,3%, e de quitina, em torno de 8,9%. Contudo, a produção de quitosana obtida na condição 8 (18%) é similar as descritas por Pochanavanich e Suntornsuk (2002) e Nadarajah et al (2001), os quais reportam rendimentos de quitosana por *Rhizopus* sp em torno de 19%.

Os resultados obtidos nesta pesquisa para rendimento de quitina e quitosana a partir de micélio de *C. elegans* (UCP 542) mostraram-se equivalentes quando comparados com experimentos conduzidos com outros microrganismos, como também, considerando as fontes tradicionais de quitina como os crustáceos (Synowieck e Al-Khateeb, 2003; Tharanathan e Kittur, 2003).

A Figura 2 mostra que a produção de quitina foi influenciada negativamente pela concentração de sacarose, glicose e NaCl no meio de cultivo, embora a interação entre esses componentes apresente influência positiva. Por outro lado, a produção de quitosana foi influenciada positivamente pela concentração de glicose e NaCl; contudo, a sacarose apresentou influência estatisticamente significativa.

Andrade et al. (2000) e Andrade et al (2003) realizaram planejamentos fatoriais para otimizar, respectivamente, a produção de quitina e quitosana por *C. elegans* (IFM 46109), modificando a composição do meio de cultivo em relação à concentração de glicose, asparagina e tiamina. Os autores observaram que o aumento da concentração de glicose promoveu maior rendimento de quitina e quitosana, respectivamente, de 24% e 8%. Franco et al. (2005), relatam rendimentos de quitina, em torno 28% e de quitosana de 7,8% a partir

da massa micelial de *C. elegans* (IFM 46109), crescida na presença de 6% de glicose. Andrade et al (2003) ao estudarem a produção de quitina por *Mucor javanicus*, em meio de cultivo com 6% de glicose, obtiveram valores em torno de 23,9%. Amorim et al (2001), descreve rendimento de quitosana extraída de *Mucor racemosus* de 40% e de *C. elegans* (URM 46109) de 20%, em meio de cultivo contendo 2% de glicose.

A caracterização pelo espectro infravermelho da quitina e quitosana obtidas por *C. elegans* em meio descrito por Hesseltine e Anderson (1957) de acordo com as condições 2 e 8 do planejamento fatorial, foram similares àquelas registradas na literatura (Amorim et al, 2001; Andrade et al, 2000; Franco et al, 2005). Os resultados mais significativos nesta análise foram aqueles demonstrados pelas bandas amida, aproximadamente 1658, 1559 and 1378 cm^{-1} (Figura 3), que pode ser apontado para o acoplamento com C=O, a deformação N-H no plano CONH e a ligação CN com deslocamento de CH_2 . Do mesmo modo, a quitina de *C. elegans* mostra bandas amida na região II, que foram 1559 e 1558 cm^{-1} . Estes resultados são apoiados pelas pesquisas realizadas por Shigemasa e Minami (1996). Andrade et al (2003) e Franco et al (2005), os quais registraram que a estrutura da quitina contém dois tipos de grupos amida e que ambos formam $\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}-\text{H}$ bandas intermoleculares ligadas, que são também receptores para o grupo CH_2OH .

Segundo Santos et al (2003) a deacetilação e o processo de regeneração, causam disfunções no retículo cristalino da quitina, induzindo uma reordenação nas ligações de hidrogênio em quitosana. Isto pode ser observado na banda central aproximadamente 3483 cm^{-1} e 3305 cm^{-1} , na região de deformação axial de OH, que aparece sobrepondo às bandas de deformação axial de NH, indicando a formação da ligação de hidrogênio, e o deslocamento da alta frequência de banda indica um decréscimo na ordem estrutural. Estes dados estão de acordo com a literatura de Amorim et al, 2001; Andrade et al, 2000; Pochanavanich e Suntornsuk, 2002; Santos et al, 2003; Franco et al, 2005 quando comparados ambos polissacarídeos, quitina e quitosana, obtidas pelos métodos microbiológicos e caracterizados pelo espectro infravermelho. Os resultados obtidos com o aumento de quitina e quitosana mediados pelo efeito do estresse salino e presença de glicose vem ressaltar a importância do método na produção microbiológica dos co-polímeros, considerando as suas amplas aplicações industrial, ambiental e na área médica.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FACEPE e FINEP.

REFERÊNCIAS

Amorim, V.S.R.; Souza, W; Fukushima, K; Campos-Takaki, G.M. 2001 Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture *Braz. J. Microb.*, **32**, 20.

Amorim, V.S; Ledingham, W.M.; Fukushima, F.; Campos-Takaki, G.M. 2005 Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, **31**, 19-23.

Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki, G.M. 2000 Factorial desing analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microb.*, **46**,1042.

Andrade, V.S; Neto, B.B; Fukushima, K; Campos-Takaki, G.M. 2003 Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570)- A factorial study. *Rev. Iberoamer. Micol.*, **20**,149.

Campos-Takaki, G.M. 2005 *In: Chitin and chitosan opportunities and challenges*. Dutta, PK. (ed), SSM: International Publication, India.

Castilo, G.; Demoulin, V. 1997 NaCl salinity and temperature effects on growth of the three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. *Mycolog. Res.*, **101** (3), 341.

Chung, Y.C; Su, YP; Chen, C.C; Jia, G.; Wang, H.L.; Wu, J.C.G.; Lin, J.G. 2004 Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, **25**(7),932.

Cimerman, N.G.; Zalar, P.; Hog, S.; Plemenitas, A. 2000 Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microb. Ecol.*, **32**, 235.

Diaz, T.M.L.; Gonzáles, C.J.; Moreno, B.; Otero, A. 2002 Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiol.*, **19**, 1.

Edgley, M. & Brown, A.D. J. 1983 Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *Gen. Microbiol.*, **129**, 3453.

Edwards, J.; Chamberlain, D.; Brosnan, G.; West, D.; Stanley, M.S.; Clipson, N.J.W.; Hooley, P.A. 1998. A comparative physiological and morphological study of *Dendryphyella salina* and *D. arenaria* in relation to adaptation to life in the sea. *Mycol. Res.*, **102** (10), 1198.

Franco, L.O; Stamford, T.C.M; Stamford, N.P; Campos-Takaki, G.M. 2005 Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* IFM 46109. *Rev. Analyt.* **3**(10), 40.

Jonathan, S.G.; Fasidi, I.O. 2003 *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana.. *Food Chem.*, **81**, 481.

Gomes, P.F.; Nascimento, A.E.; Okada, K.; Messias, A.S.; Sharia, A.E.N.; Campos-Takaki, G.M. 2000. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and prospects. p.82.

Jonathan, S.G.; Fasidi, I.O. 2003 Studies on *Psathyrella atroumbonata* (Pegler) a nigerian edible fungus. *Food Chem.*, **81**, 481-484.

Kato, Y.; Onishi, H.; Machida, Y. 2003 Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr. Pharmaceut. Biotechn.*, **4**(5), 303.

Lenartovicz, V.; Souza, C.G.M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. 2003 Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem.*, **38**, 1775.

Loureiro, E.S.; Filho, A.B.; Almeida, J.E.M.; Leite, L.G.; Lamas, C. 2002 Efeito da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum* (HOOG & EVANS). *Arqui. Inst. Biol.*, **69**, (2), 79.

Mert, H.H. & Dizbay, M. 1997 The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species. *Mycopathologia*, **61**,125.

Murugan, R.; Ramakrishna, S. 2004 Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*, **25**, 3829.

Nadarajah, K.; Kader, J.; Marmira, M.; Paul, D.C. 2001 Production of chitosan by fungi. *Pakist. J. Biolog. Sci.*, **4**(3), 263.

Plaza, P.; Usall, J.; Teixidó, N.; Viñas, I. 2003 . Effect of water activity, and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum sp.* *Can. J. Appl. Microbiol.*, **94**, 549.

Pochanavanich, P. & Suntornsuk, W. 2002 Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microb.*, **35**, 17.

Radwan, S.S.; El-Essawy, A.A.; Helal, G.A. 1984 Salinity-loving fungi in Egyptian soils I. Numbers, identities, and halophilism. *Mickrobiol.*, **139**, 435.

Rodrigues, A.M. & Santanna, E.S. 2001 Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Cienc. Tecnol. Alim.*, **21** (1), 57.

Santos, H.; Lamosa, P.; Costa, MS. 2001 Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. *Bol. Biotec.*, **69**, 2.

Santos, J.E.; Soares, J.P.; Dockal, E.R.; Filho, S.C.; Cavalheiro, E.T.G. 2003 Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polím.: Ciên. Tecnol.*, **13** (4), 242.

Shigemasa, Y.& Minami, S. 1996 Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.*, **17**, 383.

Synowiecki, J. & Al-Khatteb, N. A.A.Q. 1997 Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem.*, **60** (4), 605.

Synowiecki, J. & Al-Khatteb, N.A.A.Q. 2003 Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.Nutrit.*, **43** (2), 144.

Takeuchi, H; Yamamoto, H; Kawashima, Y. 2001 Mucoadhesive nanoparticles systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47** (1), 39.

Tekere, M.A.Y.; Zvauya, R.; Read, J.S. 2001 Growth dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Micob. Technol.*, **28**, 420.

Tharanathan, R.N.; Kittur, F.S. 2003 Chitin —The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Chitin. Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.*, **43** 10, 61.

Torzilli, A.P. 1997 Tolerance to high temperature and salt stress by a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, **85**, 786 .

Yadav, A.V.; Bhise, S.B. 2004 Chitosan: a potencial biomaterial effective against typhoid. *Curr. Sci.*, **87** (9), 1176.

Wang, R.; Khan, A.A.; Cao, W; Cerniglia, C.E. 2000 Cloning, Sequencing, and Expression of Gene Encoding Enolase from *Cunninghamella elegans*. *Micology Research*, **104** (2), 1756.

Weits, H.J.; Ballard, A.L.; Campbell, C.D.; Kilham, K. 2001 The effect of culture condition on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. *FEMS Microbiol. Let.*, **202**, 165.

TABELAS

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial que estuda a influência de 3 fatores na produção de quitina e quitosana por *C. elegans*. As condições 9 a 12 referem-se ao ponto central, que equivale às médias dos dois níveis extremos.

Condições	Níveis		
	Glicose	Sacarose	NaCl
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9 ^a	0	0	0
10 ^a	0	0	0
11 ^a	0	0	0
12 ^a	0	0	0

Concentração de glicose: 1,0g/L nível(-1); 2,5g/L nível (0); 4,0g/L nível (+1); Concentração de sacarose: 1,0 g/L nível (-1); 1,5 g/L nível (0); 2,0 g/L nível (+1); Concentração de NaCl: 1,0 % nível (-1); 2,5% nível (0); 4,0% nível (+1); ^a: Repetições.

FIGURAS

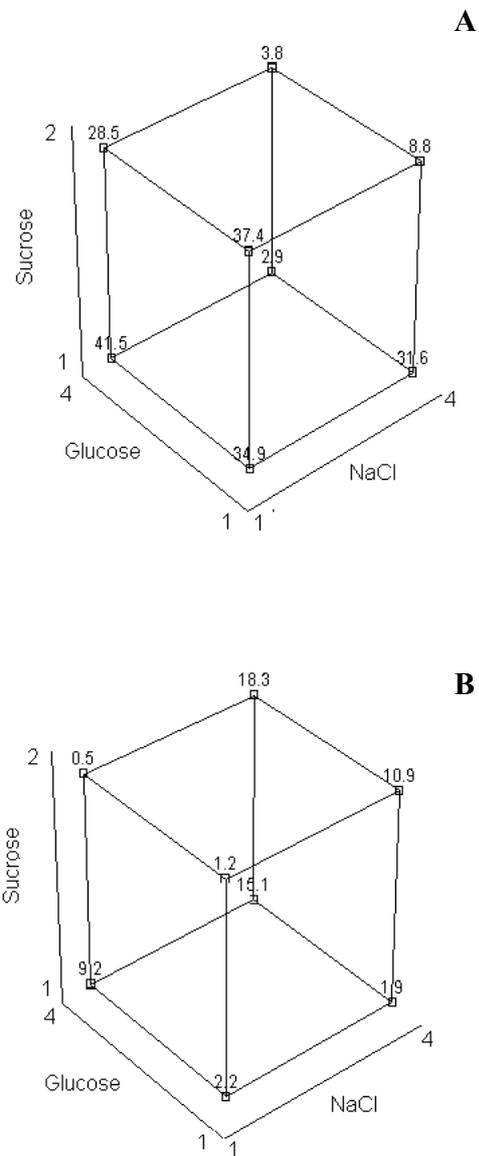


Figura 1: Quitina (A) e Quitosana (B) produzidas por *C. elegans* UCP 542 e crescidas durante 72 horas após o pré-inóculo, em meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de glicose, sacarose e NaCl, de acordo com o planejamento fatorial.

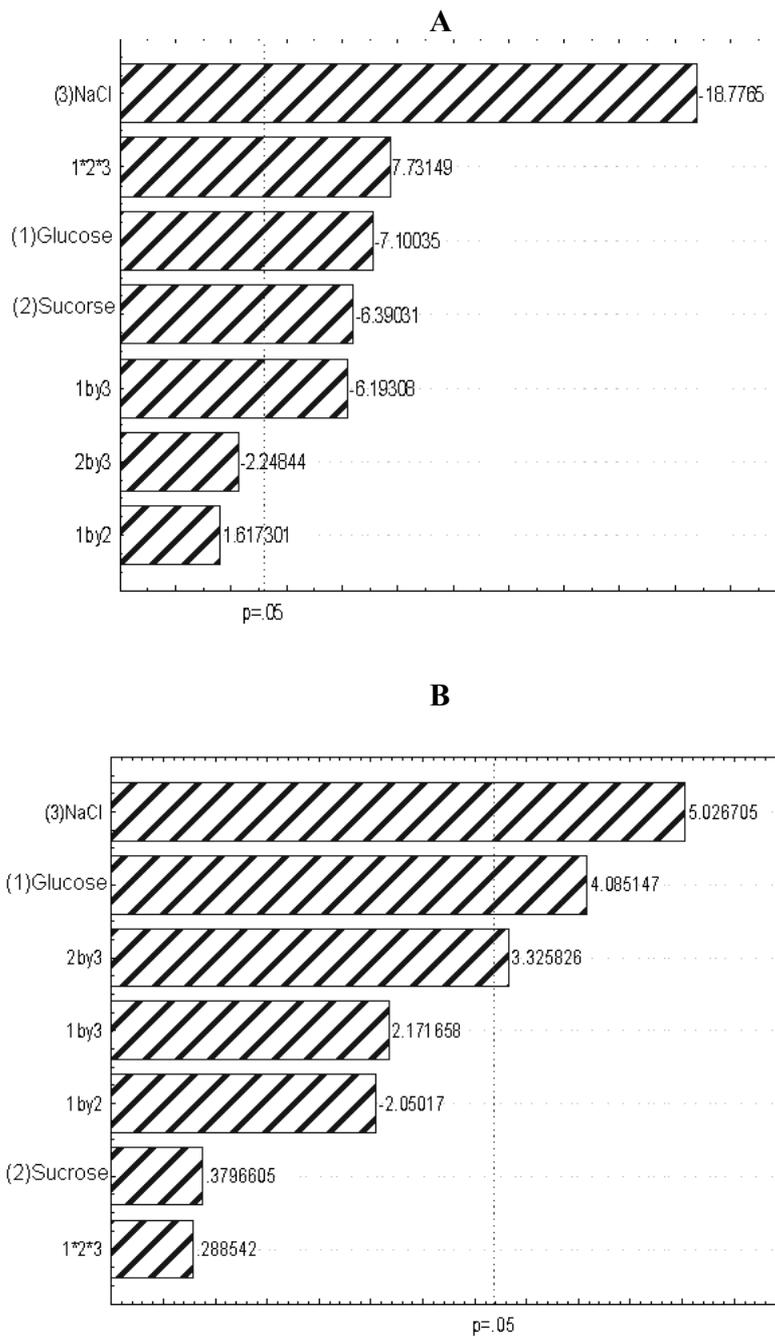


Figura 2. O gráfico de Pareto mostra o efeito da concentração da glicose, sacarose and NaCl e os efeitos da interação entre esses fatores em quitina (A) e quitosana (B) produzidas por *C. elegans* UCP 542.

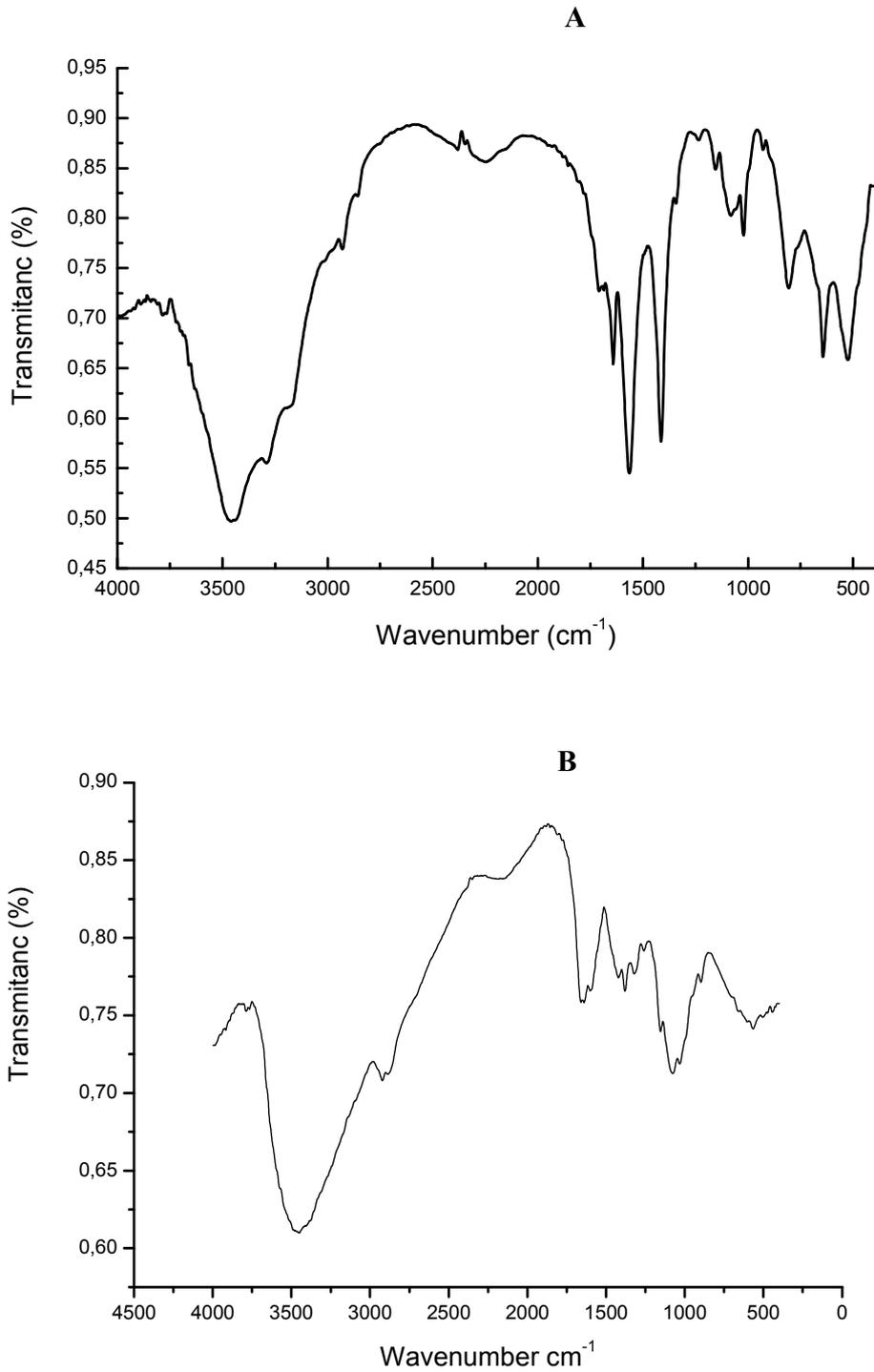


Figura 3: Espectroscopia de Infravermelho de quitina (A) e quitosana (B) extraídos de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) crescido em meio Hesseltine & Anderson de acordo com as condições 2 e 8 do planejamento fatorial, respectivamente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com *Cunninghamella elegans* com o estresse salino e fontes de carbono, conclui-se:

Artigo I

- *Cunninghamella elegans* (UCP 542) cresce na presença de NaCl associado às fontes de carbono de acordo com o planejamento fatorial, porém o seu crescimento é retardado;
- Na presença de NaCl associado às fontes de carbono, os esporangiólos globosos sofrem uma redução na quantidade, enquanto os subglobosos e elipsóides aumentam.
- A produção de clamidósporos é decorrente do estresse salino nas concentrações de 2,5 e 4,0%;
- O consumo de carboidratos totais pelo fungo ocorre nas condições de estresse salino e funciona como estratégia metabólica de sobrevivência.

Artigo II

- As concentrações de NaCl (2,5 e 4,0%) associado às fontes de carbono glicose e sacarose influenciam diretamente a produção de quitina e quitosana;
- A sacarose é o constituinte do meio de cultura que menos influencia no aumento da produção da quitina e quitosana;
- O NaCl associado a glicose são os constituintes que mais influenciam no aumento da produção da quitosana;
- Os três componentes, juntos, NaCl, D-glicose e sacarose influenciam apenas a produção da quitina;

- Os resultados obtidos permitem indicar que o estresse salino, associado às fontes de carbono D-glicose e sacarose, são condições importantes para a produção dos biopolímeros quitina e quitosana.

ANEXOS

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit

www.springeronline.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles.

Instructions to Authors

The World Journal of Microbiology & Biotechnology welcomes research papers, short communications, short notes, technical communications and review papers.

Full-length Research Papers:

These should describe new and carefully confirmed findings. Experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Short Communications:

A Short Communication is suitable for recording the results of complete but small investigations or giving details of new methods, techniques or apparatus. Short communications are two printed pages in length. Progress reports are not acceptable.

Short Notes:

Short Notes are one printed page in length. They are suitable for reports of simple findings such as the properties of an already well described enzyme or of observations not requiring elaboration. They should be written with a short (40-word) summary, no main subdivisions, they may contain one table or figure, or two if the text is brief, and no more than three references.

Technical Communications:

These are reports of processes or procedures which may be published as an annex to a full-length paper or on their own provided that the work described is of sufficient interest to other workers in the field.

Review Papers:

These should be submitted only after consultation with the Editor. They will be limited to no more than 8 printed pages.

Manuscript Presentation

Manuscripts not conforming to the instructions below will be returned for reformatting without review. You should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journal website at <http://www.springeronline.com>. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. If English is not your first language please ensure that the language is corrected by a fluent English speaker or via www.manuscript-improvement.com before submission.

Manuscripts submitted in poor English may be returned for revision without review. Text should be formatted to fit A4 or US Letter paper size, leaving 2.5 cm margins on all sides of the text. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- running head (shortened title)
- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Summary

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The summary should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. It should be page 2 of the manuscript with the title repeated on that sheet.

Key Words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations should be explained at first occurrence in the text though extensive mathematical symbols should be defined collectively before the introduction begins on page 3. A list of abbreviations which need not be defined is given in Table 1 at the end of this document.

Main text

Presentation of the main text depends on the type of article. For guidance on this respect you should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journals' website at www.springeronline.com.

Sections headings should be clearly distinguishable but not numbered. If you decide to use notes, please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the references. Please consult a current issue for the styles. References are cited in the text by giving the name(s) of the author or authors up to two and the year. When there are more than two authors, only the first author's name should be given followed by *et al.* In the event that a cited author has two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a, b etc. after the date to distinguish the works.

Full-length Research papers should be presented under the following headers:

Introduction (including a consideration of the current literature and the objectives of the study), **Materials & Methods** (with sufficient detail to allow the work to be repeated), **Results & Discussion** (focus the reader's attention on your key results and put your key results into the context of current information) and **Conclusions** (please avoid unwarranted or unsupported speculations).

The style of main sections of *Short Communications* need not conform to that of full-length papers. However, we encourage authors to present the main text under the following headers: Introduction, Materials & Methods, Results & Discussion and Conclusions.

Acknowledgements

Acknowledgements (including funding agencies and help from other colleagues) should follow the main text and precede the references.

References

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the paper in **alphabetical** order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Attwood, T.K. & Parry-Smith, D.J. 1999 *Introduction to Bioinformatics*. pp. 69–80. Harlow: Addison Wesley Longman. ISBN 0–582–32788–1.

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Steinbuchel, A. 1996 PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In *Biotechnology*, 2nd edn, Vol 6, ed. Rehm, H.-J. Weinheim: VCH Publishers.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Charnley, A.K. 1992 Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In *Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin*, ed Lomer, C.J. & Prior, C. pp. 181–190. Oxford: C.A.B. International. ISBN 0–5198779–6.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; full title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below.

Saha, B.C. & Zeikus, J.G. 1989 Improved method for preparing high maltose conversion syrups. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 299–303.

References to technical reports or doctoral dissertations, which **must** be in the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Singh, K.L. 1997 *Physiological and biochemical studies on microbes isolated from the harsh conditions*. Ph.D Thesis, BHU, Varanasi, India.

Figure Legends

Figure legends should follow the references on a separate page and precede the tables. Each figure should be mentioned in the text.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Please provide a short explanatory caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript. In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multipart figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Policy on Colour Figures:

Springer treats the inclusion of color figures on a per article basis and offers two options 1) Free Online Color, the color figures will only appear in color on the journals' website and b/w in the printed version of the journal 2) Online and Printed Color which comes at a charge of Euro 950/ USD 1150 per article. The color figures will appear in color on the website and in the printed version of the journal.

Symbols and Units

Only recommended SI units should be used. Authors may use either superscript presentations (mg ml^{-1}) or the solidus (/) presentation (mg/ml). When giving the concentration of a solution in a solvent the correct description is, for example, 10 g glucose/100 ml, not 10 g/100 ml glucose. The term % used to express a concentration must be used correctly, i.e. g per 100 g solution; otherwise % (v/v) or % (w/v) should be used for solutions of concentration greater than 1%. For solvent mixtures use, for example, butan-1-ol/acetic acid/water (4:1:1, by vol.) or chloroform/methanol (2:1, v/v).

Nomenclature

Chemical and biochemical nomenclature should follow the IUPAC-IUB Commission guidelines; appropriate guidelines are given in, for example, *Policy of the Journal and Instructions to Authors*, The Biochemical Society, 59 Portland Place, London W1N 3AJ, UK and references therein. This document is available online at <http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm>. The Enzyme Commission (EC) number for enzymes should be given at the first time of mention; see *Enzyme Nomenclature* (1992), Academic Press; London & New York, or visit <http://www.expasy.org/enzyme/>. Microorganisms must be correctly named using the current codes for bacteria, yeasts, fungi, algae and protozoa; (see *Microbiology* 1999, 145 (January), p. viii). Guidelines for genetic nomenclature are quoted in the same publication. For further information on quantities and units, see Table 2 at the end of this document.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours!

Corrections should be sent as an e-mail attachment to:

proofscorrection@springer-sbm.com.

Always quote **the four-letter journal code** and **article number** from your proof in the subject field of your e-mail.

Offprints

Fifty (50) offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charge

No page charges are levied on authors or their institutions.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher (see section Manuscript Submission). This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Manuscript Submission

The World Journal of Microbiology and Biotechnology has a fully web-enabled manuscript submission and review system. This system offers authors the option of tracking in real time the review process of their manuscripts. The online manuscript and review system offers easy and straightforward login and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats:

For manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX

For figures - TIFF, EPS, PS, GIF, JPEG and PPT

PDF is NOT a recommended format.

Manuscripts should be submitted to:

<http://wibi.edmgr.com>

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from this system.
Please send a completed and signed form either by mail or fax to the *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Office.

**The World Journal of Microbiology and Biotechnology,
Springer, Journals Editorial Office
Van Godewijckstraat 30
3311 GX Dordrecht
The Netherlands**

Fax: (+31) 78 6576254

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also as printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the toolbar. The conventional way of submitting your manuscript (e.g. mailing printout + disk) is NOT possible.

Submitted manuscripts should not be in consideration in whole or in part by another journal. Nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal.

IMPORTANT: Please supply the names in the Enter Comments box of Editorial Manager of not less than three suitably qualified persons whom the editors might wish to consider as possible reviewers of your manuscript.

Table 1: Abbreviations and Conventions. These abbreviations may be used without definition.

(i) General	
ADP, CDP, GDP, IDP, UDP, XDP, dTDP	5'-pyrophosphates of adenosine, cytidine, guanosine, inosine, uridine, xanthosine, thymidine
AMP etc. ATP etc.	adenosine 5'-phosphate, etc. adenosine 5'-triphosphate, etc
Approx.	approximately (not c. or ca.)
Aq.	aqueous
BSA	bovine serum albumin
CM-cellulose	carboxymethylcellulose
CoA, CoASH	coenzyme A
conc.	concentrated
Cyclic AMP	adenosine 3':5'-cyclic

cAMP, etc.	monophosphate, etc.
DEAE-cellulose	diethylaminoethylcellulose
DNA	deoxyribonucleic acid
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNAase	deoxyribonuclease
DMSO	dimethyl sulphoxide
EDTA	ethylenediaminetetra-acetate
FAD	flavin-adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
GSH, GSSG	glutathione, reduced and oxidized forms
IgG, IgM, etc.	immunoglobulin G, M, etc.
i.r.	infrared
LPS	lipopolysaccharide
LD ₅₀	median lethal dose
MIC	minimal inhibitory concentration
NAD ⁺	nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized (NADH for reduced form)
NADP ⁺	nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized (NADPH for reduced form)
NTG	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
Pi/PPi	orthophosphate, pyrophosphate
ppGpp	guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate
pppGpp	guanosine 3'-diphosphate 5'-triphosphate
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethanesulphonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
tRNA	transfer ribonucleic acid
RNAase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulphate
u.v.	ultra-violet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-galacto-pyranoside

(ii) Scintillants

BBOT	2,5-di[5'-tert-butylbenzoxazolyl-(2')]thiophen
Butyl-PBD	2-4(4'-tert-butylphenyl)-5(4"-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole
Dimethyl-POPOP	1,4-di-2-(4-methyl-5-POPOP phenyloxazolyl) benzene
POPOP	1,4-di-2-(5-phenyloxazolyl) benzene
PPO	2,5-diphenyloxazole

(iii) Buffers

Aces	<i>N</i> -(2-acetamido)-2-amino ethanesulphonic acid
Ada	<i>N</i> -(2-acetamido) iminodiacetic acid
Bes	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-amino ethanesulphonic acid
Bicine	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)glycine
Caps	3-cyclohexylaminopropanesulphonic acid
Chaps	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulphonic acid
Ches	2-(cyclohexylamino)ethane sulphonic acid
Hepes	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulphonic acid
Hepps	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine-
Mes	<i>N'</i> -3-propanesulphonic acid 2-(<i>N</i> -morpholino)ethane sulphonic acid
Mops	3-(<i>N</i> -morpholino)propane sulphonic acid
PBS	phosphate-buffered saline (<i>but composition must be specified</i> !)
Pipes	piperazine- <i>N,N'</i> -bis-2-ethane sulphonic acid

Tes	<i>N</i> -tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulphonic acid
Tricine	<i>N</i> -tris-(hydroxymethyl) methyl glycine
Tris	tris(hydroxymethyl) methylamine

(iv) Techniques

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESR (or EPR)	electron spin (paramagnetic) resonance
FPLC	fast protein liquid chromatography
GC (or GLC)	gas chromatography (or gas-liquid chromatography)
GC-MS	gas chromatography combined with mass spectrometry
HPLC	high-pressure (performance) liquid chromatography
HPTLC	high-pressure thin-layer chromatography
MIC	minimum inhibitory concentration
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
Py-MS	pyrolysis mass spectrometry
Py-GC	pyrolysis gas chromatography
RIA	radioimmunoassay
TLC	thin-layer chromatography

(v) Units

bp	base pairs
c.f.u.	colony-forming units
c.p.m.	counts per minute
Da, kDa,	daltons, kilodaltons,
MDa	megadaltons
d.p.m. (or d.p.s.)	disintegrations per minute (second)
kb (or kpb)	kilobase pairs
p.f.u.	plaque-forming units
rev/min (rev. min ⁻¹)	revolutions per minute

Table 2: Selected Symbols for quantities and units

(i) Space, time and related quantities

<u>Quantity</u>		<u>Unit</u>
<i>l</i>	length	m, mm, μm (not μl), nm (not \AA), etc.
<i>V</i>	volume	l (or dm^3), ml (or cm^3), μl (or mm^3) etc.
λ	wavelength	nm (not ml or \AA)
<i>t</i>	time	h (not hr), min (not mn), s (not sec), ms, etc.
ν , <i>f</i>	frequency	Hz

(ii) Mechanical and related quantities

<u>Quantity</u>		<u>Unit</u>
<i>m</i>	mass	kg, g, mg, etc.
<i>F</i>	force	N (kg m s^{-2})
<i>E</i>	energy	J (not cal)
ρ , <i>P</i>	pressure	Pa (N/m^2) 1 bar = 10^5 Pa; 1 atm = 101325 Pa;

<i>S</i>	sedimentation coefficient	$S = 10^{-13} \text{ s rad}^{-2}$
<i>g</i>	centrifugal field	(9.81 $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$)

(iii) Molecular and related quantities

<u>Quantity</u>		<u>Unit</u>
<i>m</i>	molecular mass	Da(dalton), kDa, etc
<i>n</i>	amount of substance	mol, mmol, etc.
<i>M</i>	molar mass	g/mol or kg/mol
<i>m_m</i>	relative	-
<i>M_r</i>	molecular mass	-

(iv) Chemical reactions

<u>Quantity</u>		<u>Unit</u>
<i>K</i>	equilibrium constant	
<i>K_m</i>	Michaelis constant	M, mM, etc.
<i>K_i</i>	inhibition constant	M, mM, etc.
<i>K_d</i>	dissociation constant	M, mM, etc.
<i>k</i>	rate constant	s^{-1} , or $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
<i>v</i>	rate of reaction	M (or mM, etc.) s^{-1}
—	enzyme activity	kat
<i>V</i>	rate of enzyme catalysed reaction at infinite concentration of substrate	M (or mM, etc.) s^{-1}

(v) Electricity, magnetism and electromagnetic radiation

<u>Quantity</u>		<u>Unit</u>
<i>I</i>	electric current	A
<i>R</i>	resistance	Ω
<i>I</i>	luminous intensity	cd
<i>T</i>	transmittance (I/I_0)	—
<i>A</i>	absorbance ($-\log T$)	—
<i>D</i>	attenuance	—
ϵ	molar absorption coefficient	$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
—	radioactivity	Bq(=1 dis. s^{-1}) or Ci(37 CBq)

Additional Information

Mike van den Bosch, PhD
 Publishing Editor
 Springer
 P.O. Box 17
 3300AA Dordrecht
 The Netherlands

Phone: +31(0) 78 6576-188
 Fax: +31(0) 786576-388
 mike.vandenbosch@springer-sbm.com



Notes to Authors

FEMS Microbiology Ecology

AIMS AND SCOPE

The Editors aim to ensure efficient publication of high quality papers that are original and provide a significant contribution to microbial ecology. The journal contains Research Articles and MiniReviews on fundamental aspects of the ecology of microorganisms in natural soil, air and aquatic habitats, or in artificial or managed environments. Articles describing work on pure cultures must fully relate the work to the environments they are designed to investigate. Research papers on plant pathology, medical or veterinary microbiology will be published only if they provide valuable information on microbial ecology in general.

Papers can deal with any sort of microorganisms: bacteria, filamentous fungi and yeasts, protozoa, algae or viruses. Papers should be complete in themselves and adequately be supported by experimental detail; they should not be preliminary versions of communications to be published elsewhere. Descriptions of new methods are acceptable, and the Editors are also prepared to consider papers that put forward new hypotheses. However, papers that provide confirmatory evidence or merely extend observations firmly established in one species or field site to another will not be accepted unless there are strong reasons for doing so.

MINIREVIEWS

MiniReviews are concise articles covering topics of current interest or controversial aspects of subjects within the scope of the journal. The style for MiniReviews is the same as for the rest of the journal with the following amendments: the maximum length of the text is about 12 printed pages (7000 words); a combined total of six figures and tables is allowed. The number of references should normally not exceed 50. Colour figures or diagrams are encouraged and will be printed in the journal free of charge providing the Editor believes that the use of colour adds value to the MiniReview. There is no rigid format for MiniReviews but they should generally include an Abstract and a brief Introduction in which the background to the article is presented. It is then helpful if the remainder of the text is arranged under a single, or a maximum two levels of subheading, finishing with a Conclusion or Outlook section.

MiniReviews are normally invited, but prospective authors are encouraged to contact the Chief Editor to discuss possible contributions.

An account for Manuscript Central will be created for authors invited to write a MiniReview.

SUBMISSION PROCEDURES

Manuscripts should be submitted to the Chief Editor or an Editor with appropriate scientific interests through Manuscript Central® <http://mc.manuscriptcentral.com/fems>, which is a web-based manuscript submission, reviewing and tracking system used by FEMS. Manuscript Central shortens the time needed for processing and peer reviewing manuscripts and so leads to an improved service to authors.

Authors who do not have the technology to submit papers in this way should submit three paper copies of their manuscript and a disk with all files to: FEMS Publications Office, c/o Chief Editor FEMS Microbiology Ecology, Keverling Buismanweg 4, 2628 CL Delft, The Netherlands.

First-time users should generate a user account. Please also fill in your telephone and fax number in the account fields. Select *FEMS Microbiology Ecology* when logging-in.

To submit a manuscript, go to the Submitting Author Center. From there you can click on the Submit a Manuscript link in

the Menu Bar, which takes you to step 1 of the seven-step process of submitting a manuscript. The progress bar on the left side of the screen will help you navigate the process.

Fill in the boxes in each step with the appropriate information (required fields (req) are indicated). Use the "Next" button to move from step to step, backtrack to correct errors with the "previous" button or use the progress bar on the left side of the screen. You can copy and paste large amounts of text like the title and abstract to save time.

You must specify preferred and non-preferred reviewers and preferred Editors for your manuscript. Journal Editors, when assigning reviewers for your manuscript, take preferred and non-preferred reviewers into consideration.

If the submitting (contact) author is not the same as the formal corresponding author, this can be indicated in step 5. Please be sure to have this correctly stated on the title page.

After uploading your manuscript files (sending them to FEMS via the Manuscript Central online system), you reach the last step (Review & Submit). You must check that the manuscript has been accurately converted to a PDF and HTML file before using the "Submit" button to activate submission to the Chief Editor. If you do not receive email confirmation of your submission within 24 hours contact mailto: submission@fems-microbiology.org. You should keep a copy of both the original document and the PDF file generated by the system. A manuscript number will be assigned to your submitted manuscript, which will be used in all correspondence.

More instructions on the submission procedure can be found in the "[FEMS Submission Instructions](#)", which can be reached via the "Instructions and Forms" button at the top right of all Manuscript Central pages.

Members of the Editorial board and other appropriate experts will referee the papers. Editors handling papers will make decisions on acceptance/revision/rejection independently based on the referees' reports.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

A recent issue of *FEMS Microbiology Ecology* should be consulted for guidance on format and style. Please download a recent sample copy from <http://www.elsevier.com/locate/femsecol>. Up-to-date Notes to Authors are also available via the Journals page of the FEMS Website (<http://www.fems-microbiology.org/>).

1. Language

Papers should be in English (either British or American spelling). Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the language; manuscripts that are deficient in this respect may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier, 4F Higashi-Azabu, 1 Chome Bldg, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044; phone: +81 (03)-5561-5032; fax: +81 (03)-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com.

2. Presentation of manuscripts; preferred format

It is possible to submit manuscripts in a variety of ways through our submission interface. However, *FEMS Microbiology Ecology* strongly recommends that you compile your manuscript in MS Word and save it as a DOC file, using the following lay-out.

- a) Start with the title page, followed by the abstract, main body and references.
- b) Next add the tables within the same document, starting each new table on a separate page.
- c) Follow the tables with the figure legends.
- d) Finally add the figures, putting each figure on a separate page ensuring that the figure is at least the size it will be in the final printed document (try not to resize). Add the figure number (e.g. Fig. 1) to each page well outside the boundary of the space occupied by the figure. Check that the incorporated figures can be printed as close as possible to the original resolution of the figures in the package in which they were generated. If you wish to upload separate figure files, Manuscript Central will combine your manuscript main body and figure files into one file. Please ensure that you upload the figures only once, i.e. either embedded in the main body with figures embedded or without if you upload the figures separately.
- e) Even though our online submission procedure is electronic, peer reviewing will often be based on a print-out. It is therefore essential that page and line numbering are both active in the submitted document.
- f) The right-hand margin justification should be switched off. Artificial word breaks at the end of lines must be avoided. The manuscript should be double-spaced (including references, tables and legends for figures) with wide margins. The beginning of each new paragraph must be clearly indicated by indentation.
- g) If you do not use MS Word then save in MS Word format in the word processor that you use.

- h) Please use standard fonts (Arial, Times New Roman, Symbol, Helvetica, Times), otherwise symbols might change or go missing in case the font you used is converted to a standard font. In your Word document, on the Tools menu, click Options, and then click the Save tab. Select the Embed TrueType fonts check box.

3. Length

There is no maximum length for papers, but the length should be consistent with the original content and authors are urged to be concise. Excessively long reference lists should be avoided. Repetition of information in the text and illustrations should not occur. Very short papers (less than 2000 words including all) should not be submitted. Short communications should normally be submitted to *FEMS Microbiology Letters*. Occasionally, short papers may be published in *FEMS Microbiology Ecology* if they offer a significant, though small, increase in knowledge or understanding of the field.

4. Revision

Papers may be returned to authors for modification of the scientific content and/or for shortening and language corrections. Revised versions must be submitted through the online system Manuscript Central. For this purpose you will find that you can click "create revision" on the list of manuscripts with a decision. We need a source file (DOC or RTF format) to be uploaded, to be able to use your files for production. You must submit one file for each figure clearly indicating the changes that have been made. Figures should be submitted in separate files at sufficient resolution for publication at this stage (see section 8).

Suggestions by the Editors about revision do not imply that a revised version will necessarily be accepted. If a paper that is returned to the authors for amendment is not resubmitted within two months it will be regarded as having been withdrawn. Any revised version received subsequently will be treated as a newly submitted manuscript and the date of receipt will be altered accordingly. Authors who feel that there are substantial grounds for disagreement with an Editor's decisions should contact the Chief Editor, whose decision will be final.

5. Title, authors and keywords

The paper should not form part of a numbered series but should be headed by a concise, informative title. Authors are reminded that titles are widely used in information-retrieval systems.

The title should be followed by the name(s) of the author(s) (with first or middle names in full and including all initials) and by the name(s) and address(es) of the institute(s) where they worked during the study. For multiple authors with different affiliations, please indicate the relevant affiliations. The name and full postal address, telephone and fax numbers, as well as the email address of one corresponding author should be provided in a footnote.

A list of three to six keywords must be included on the first page. Authors are requested to consult the subject indices of *FEMS Microbiology Ecology* or the list of subject headings from *Index Medicus* for preferred synonyms and standard abbreviations. Plural terms should be avoided. The title is not used for preparing the index, so important words and phrases may appear in both the title and keywords. General terms such as 'Enzyme', 'Membrane', 'Transport', etc., should be avoided or qualified, e.g. 'Enzyme activation', 'Membrane phosphorylation', 'Ion transport'.

6. General arrangement of papers

Papers should be written mainly in the past tense, but the present tense can be used to convey authors' ideas and generally accepted information. Hence, *Materials and methods* and *Results* are normally written in the past tense and the present tense is occasionally used in the *Introduction* and *Discussion*.

- a) *Abstract*. This should be about 100 words and only one paragraph. Some abstracting services use authors' summaries without modification so this section must be able to be intelligible without reference to the full paper. References should not be cited.
- b) *Abbreviations* should be avoided, but if they have to be used, they must be defined the first time they are used in the main body.
- c) *Introduction*. This should state the objectives but should not contain a summary of the results. Sufficient information should be given to explain the background to non-specialists but there is usually no need for a comprehensive literature survey.
- d) *Materials and methods*. Sufficient detail must be provided to allow the work to be repeated. Suppliers and manufacturers of materials and a brief address should be mentioned.
- e) *Results* (the presentation of data is given below).
- f) *Discussion*. This should not simply recapitulate the Results. A combined results and discussion section is encouraged when appropriate.
- g) *Acknowledgements* can be made to funding agencies, colleagues who assisted with unpublished data or reading the review, members of a laboratory who provided data previously unpublished, etc.

h) *References* (the style and format are given below).

7. Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of Elsevier's recommended file formats (<http://authors.elsevier.com>). Authors should submit the material in electronic format together with the article. Select "Supporting Documentation" or "MultiMedia" for your file designation when uploading the file through the online submission system. Do not forget to upload separately a DOC file, listing concise and descriptive captions of each file uploaded as supplementary data. Please also indicate that you have uploaded these files in your cover letter. For more detailed instructions please visit Elsevier's Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>.

8. Presentation of data

Tables and figures should be selected to illustrate specific points. Do not tabulate or illustrate points that can be adequately and concisely described in the text. Do not repeat information in both tables and figures. Together with the legend (and/or footnote) they should be understandable on their own without reference to the text.

(a) Tables. Tables and legends should be typed double-spaced. Explanatory footnotes should be related to the legend or table using superscript, lower-case letters. All abbreviations should be defined after the footnotes below the table or by reference to a previous table in the same paper.

Table 1

Growth rates of *R. ruber* strains on BA, 3-, 2-, and 4-CBA as the sole carbon source under anoxic conditions in the light

Strain ^a	Maximum specific growth rate (h ⁻¹) on ^b :			
	Parental strain		Variant	
	BA	3-CBA	2-CBA	4-CBA
API	0.060	0.029	0.005	0.003
KD1	0.074	0.019	(0.002) ^c	NG ^d
BIS10	0.039	0.020	0.005	0.002
WS17	0.062	0.020	0.008	0.002
NCTB8288	0.073	0.018	0.011	0.003
NCIMB8252	0.032	0.006	0.005	NG

^aAll parental strains were only able to degrade 3- and 2-CBA when BA (1 mM) was present as a co-substrate.

^bBA was used at 2 mM final concentration and 3-, 2-, and 4-CBA were used at 1 mM final concentration. The data shown are mean values of duplicate measurements.

^cGrowth started only after 5 weeks of incubation.

^dNG, no growth (OD_{660 nm} < 0.1).

(b) *Line art* is an artwork type commonly used for graphs and charts containing scientific data as well as hand-drawn images.

Figures should be designed for maximum clarity, to economise on space and to take account of the dimensions of the column or page. Columns are 8.5 cm wide and pages are 17.8 cm wide. Line art must be drawn following these specifications:

- Figures should be 17 cm in width (twice their final size) with wide margins.
- All lines should be drawn at 1.5 point (0.5 mm wide), broken line styles may be used to differentiate multiple plot lines if desired.
- Letters and numbers should be 16 point (capitals 4 mm high) non-serif.
- Symbols should be 3 mm in diameter; the following are preferred: ○, ●, □, ■, △, ▲, ▽, ▼. Lines drawn to accompany the points should not go through hollow symbols.
- Grid lines should not be used.
- Numbers used as axis labels should have minimum significant figures; amounts less than unity must carry a preceding zero (e.g. 0.5 not .5).
- The use of concise explanatory labels aids interpretation and so is encouraged instead of incorporating symbols in the typed legend printed below the figure or as a separate drawn legend within the figure.
- Larger composite figures may be designed to occupy 2 columns when this can achieve an overall saving in space. The

character, line and symbol sizes should be adjusted accordingly to achieve the same sizes on the printed page. For example, with a 24 cm wide figure the sizes would be: characters, 12 point, capitals, 3 mm high; lines, 1 point, 0.35 mm; symbols, 2.3 mm in diameter.

(c) *Half-tone and colour figures.* Half-tone illustrations should be very sharp with maximum contrast. Magnification should be indicated where appropriate by inclusion of a bar marker. Non-essential areas of photographs should be cut off. Photographs of electrophoretograms, etc., in which there is poor contrast may be better replaced by line drawings, but in this case the photographs should be submitted for scrutiny by the Editors. If photographs have been digitally processed to enhance their quality, this should be stated. Colour illustrations will be published free of charge provided colour is essential for the understanding of the information. Authors of MiniReviews are encouraged to make optimal use of the free-colour feature. If, together with your accepted article, you submit usable colour 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. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>. Contributions of colour pictures (and black and white figures of course) serving as cover illustrations for the journal are also welcome.

(d) *Electronic submission of Figures.* High-quality figures are required when the final version of the manuscript is submitted through Manuscript Central, and should be prepared using the following guidelines.

- Please use quality graphic programs such as Adobe Photoshop or Adobe Illustrator. When using other applications, such as Corel Draw or Freehand, please export to TIFF (see also <http://authors.elsevier.com/artwork>, application guideline box, bottom left corner).
- Please make sure your electronic figure is at the desired size for the printed article.
- For halftones you need a minimum of 300 dpi; combination artwork a minimum of 500 dpi; and for line figures preferably 1000 dpi to 1200 dpi.
- Combination artwork (artwork containing half-tone and line art elements, e.g. electrophoresis gels or Southern blots with lane and fragment sizes labeled) must be in EPS. In case the combination artwork is scanned the preferred format is TIFF with a resolution of minimal 500 dpi using LZW compression.
- The following figure formats are acceptable for our publisher (provided they are created with the instructions given above):
 - TIFF and EPS (please make sure to embed all used fonts)
 - Word (DOC), Excel (XLS) or PowerPoint (PPT)
 - Illustrator (AI) or Photoshop files (PSD)
- For each figure one file must be submitted

You will find some more helpful and simplified guidelines by clicking the "[FEMS Revision Instructions, including figures](#)" icon, which can be reached via the "Instructions and Forms" button at the top right of all Manuscript Central pages. Further detailed information can be found at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

In principle the electronic files will be used for producing the final publication, but the Publisher may request a set of high-quality print-outs of your figures for production purposes.

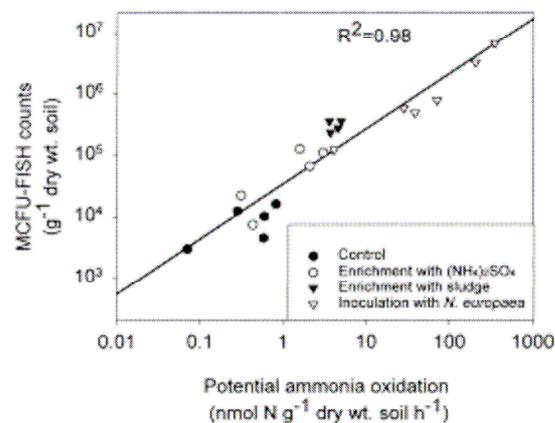


Fig. 4. Correlation between potential ammonia oxidation and MCFU-FISH counts of AOB in the bacterial fractions extracted after various soil treatments. Each point represents mean values for MCFU-FISH and potential ammonia oxidation after the same treatment and incubation time.

(e) *Figure legends*. Legends for both line-drawings and half-tones must be given on a separate page. The legends should consist of a preliminary sentence constituting a title, followed by a brief description of the way the particular experiment was carried out (but not repeating the Materials and methods section), and any other necessary material describing the symbols or lines. All abbreviations must be defined.

9. *Reproducibility of results and statistical tests*

Authors should state how many times experiments were repeated and whether mean or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible as part of, but not in place of, a proper statistical analysis. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% must be stated. Avoid values with unjustified numbers of significant figures; in most cases three significant figures is consistent with the accuracy attained in microbiological experiments.

Results of statistical tests should be presented wherever possible as evidence for conclusions. Such information must be presented concisely to illuminate the results, but not to dominate them. The tests used should be briefly described in the Materials and methods section. Details of the diagnostic checks made for the assumptions of the statistical tests and for the validity of any transformations used should be stated clearly. Further information can be found in the following references: (a) Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco; (b) Fry, J.C. (1993). *Biological Data Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

10. *Nomenclature, abbreviations and units*

Authors should follow internationally accepted rules and conventions. Authors should provide evidence for thorough identification of new isolates and use the most recent acceptable name.

Microorganisms. The spelling of bacterial names should follow the Approved Lists of Bacterial Names <http://www.bacterio.cict.fr/>. If there is a reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example, see *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1980) 30, 547-556).

Viruses. Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Enzymes. For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology as described in *Enzyme Nomenclature* <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Genes. Genetic nomenclature should essentially follow the recommendations of Demerec et al. (*Genetics* (1966) 54, 61-76), and those given in the instructions to authors of the *Journal of Bacteriology* and *Molecular and Cellular Biology* (January issues).

Biochemical compounds. Consult the *European Journal of Biochemistry* or the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>)

Abbreviations. Abbreviations should only be used as an aid to the general reader and their use should be strictly limited. Define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used: e.g. 'cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)'. Eliminate abbreviations that are not used at least six times in the manuscript.

In addition to abbreviations to the international system of units of measurements, other common units (e.g., bp, kb, Da), chemical symbols for the elements, and the standard biochemical abbreviations (see *Eur. J. Biochem.*) should be used without definition.

It is often possible to use pronouns or to paraphrase a long word after its first use (e.g. 'the drug', 'the substrate').

Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, Leu, etc.) may be used for terms that appear in full in the neighbouring text.

Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (*Biochemical Nomenclature and related Documents*, 1978) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

Reporting numerical data. The international system of units (SI) should be used; ml is acceptable in place of cm³ for liquid measures. The form for units is $\mu\text{g ml}^{-1}$ and not $\mu\text{g/ml}$; parentheses should be used to improve clarity, e.g. $\text{ml (g dry wt soil)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Multiplication of numbers should be indicated by a multiplication sign with spaces either side (e.g. 6.2×10^8) and of units by a space (e.g. mg l^{-1}).

The prefixes k, m, μ , n, and p should be used in combination with the standard units for reporting length, weight, volume and molarity for 10^{-3} , 10^6 , 10^{-9} , and 10^{-12} , respectively. Use $\mu\text{g ml}^{-1}$ or $\mu\text{g mg}^{-1}$ instead of the ambiguous ppm.

Units of temperature are presented as follows: 37°C or 324 K.

11. References

These should be numbered sequentially in the order of their citation in the text and inserted between square brackets, e.g. [1], [16-21]. The list of references should follow the order of their citation and should be double-spaced. References to journals should contain the names and initials of all authors, year of publication in parentheses, title of the paper, and the abbreviation of the title of the periodical according to *Index Medicus*. These should be followed by the volume number and first and last page numbers. References should not be given to work 'in press' unless it has been accepted for publication and if so, then journal name and year of publication should be provided. References to books should include the title of the book, the year of publication, the publishing company and the place of publication.

Examples:

- [1] Therkildsen, M.S. and Lomstein, B.A. (1993) Seasonal variation in net benthic C-mineralization in a shallow estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12, 131-142.
- [2] Dinter, Z. and van Morein, B. (1990) *Virus Infections in Ruminants*, 592 pp. Elsevier, Amsterdam.
- [3] McCarthy, A.J. (1989) *Thermomonospora*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.), Vol. 4, pp. 2552-2572. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Unpublished results and personal communications may be mentioned in the text provided that (a) the names and initials of all the persons involved are listed, and (b) they have all granted permission for the citation. Unpublished accession numbers for nucleotide sequences and similar information must be accompanied by sufficient details to allow the relevant information to be retrieved.

12. Nucleotide and amino acid sequences

Nucleotide sequences should be fully determined by sequencing both strands of the DNA. Sequence information will be accepted for publication only if: (a) it is relevant to a question of general interest, (b) there is additional, complementary information, or (c) there is some particular, explicit reason for publication.

All newly determined nucleotide and amino acid sequences must be deposited in an appropriate data bank. Authors are encouraged to use the EMBL Data Library but can also use other archives, such as GenBank. An accession number must be obtained before submission to the Editor and this fact should be mentioned in the cover letter. The accession number should be included in the main body at the end of the Materials and methods section. Authors should also include the accession number in the appropriate figure legend or refer to the Materials and methods section. The sequence data should be released to the public no later than the online publication date. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised (see example). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**". Authors are encouraged to check accession numbers very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the *printed* article, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Nucleic acid and amino acid sequences submitted as figures should be as sharp and clear as possible and retain perfect legibility after reproduction. There should be no confusion between G and C. The width should be (close to) that of the typesetting area (i.e., 178 mm) or column width (85 mm). Any additional markings should be clearly added in black ink or with a computer drawing package.

13. Careful checking

Manuscripts should be checked carefully before submission since substantial alterations made at the 'proof' stage may be charged for by the Publisher

14. Enquiries and alterations

Queries will be referred back by email to the corresponding author. The Editors reserve the right to make minor alterations to the text without altering the scientific content.

PROOFS

Manuscripts received by the Publisher are considered to be in its final form. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. A form with queries from the copyeditor may accompany the proof. It is important to ensure that all corrections are sent back to Elsevier in one communication, subsequent corrections will not be possible. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated within two working days.

OFFPRINTS

The corresponding author will receive, upon acceptance of an article by the publisher, a Copyright Transfer form (or Licence Agreement) and an Offprint Order form. On the Offprint Order form one can indicate the address to which the free offprints are to be sent and additional offprints may be ordered. Twenty-five free offprints are available for each paper.

NO PAGE CHARGES

There is no page charge for publication in any of the FEMS publications.

ETHICAL AND RELATED ASPECTS

The editors expect that new and variant organisms, viruses and vectors described in FEMS journals will be made available, under written request and for their own use, to all qualified members of the scientific community. If delays in strain or vector distribution are anticipated or if they are available from sources other than the authors, this should be indicated. The Editors encourage authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. In the case of materials that have been distributed by individuals, authors should indicate the laboratory strain designations and name and address of the donor as well as the original culture collection identification number, if any.

Papers describing experimental work with humans must include a statement that the Ethical Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work. Experiments with animals or with genetically manipulated organisms must have been done in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority. Procedures should be such that experimental animals do not suffer unnecessarily.

Submission of a manuscript implies that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review or academic thesis, in which case reference should be made in a footnote to the title) and that it is not under consideration for publication elsewhere. The corresponding author must ensure that its publication has been approved by all co-authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out and that all persons entitled to authorship have been named. If accepted, the article must not be published elsewhere in the same form in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. Each named author must be responsible for at least the part describing his or her contribution and must have seen the entire final text before submission and any substantial subsequent revisions. The Editors must be notified in writing by the corresponding author of any deviation from these rules. The articles published in *FEMS Microbiology Ecology* represent the scientific findings and opinions of the authors. Whilst the Editors and Publisher make every effort to ensure the accuracy of all published matter, they can accept no responsibility or liability, collectively or individually, for any erroneous, misleading or unintentionally damaging statements, which may appear in the journal. Authors must draw attention to chemical or biological hazards that may be involved in materials and methods used in experiments.

REQUESTS FOR PERMISSION TO REPRODUCE MATERIAL FROM PUBLISHED ARTICLES

Individuals wishing to reproduce figures, tables and excerpts of text (not exceeding 250 words) from articles published in *FEMS Microbiology Ecology* for non-commercial purposes may do so providing the original publication is acknowledged accordingly and the authors' approval is obtained, and in this case no special permission is needed from either the Publisher or the Editors. Authors may also include the article in a thesis without special permission. In all other cases, permissions may be sought directly from Elsevier's Rights Department in Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830.

fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

INFORMATION FOR AUTHORS AND READERS

The Editors and Publisher are always willing to hear from authors and readers and consider their views sympathetically. Please note the following contact details:

- For helpful and simplified guidelines on the submission of high-quality figures for the final version of your manuscript, please refer to “[FEMS Revision Instructions, including figures](#)” icon, which can always be reached via the “Instructions and Forms” button at the top right of all Manuscript Central pages. Further detailed information on figures can be found at <http://authors.elsevier.com/artwork>
- Queries related to submission: email submission@fems-microbiology.org
- Manuscripts under review: consult the Submitting Author Center at <http://mc.manuscriptcentral.com/femsec>
- Status of accepted articles: consult the Author Gateway from Elsevier at <http://authors.elsevier.com>
- Questions arising after acceptance of an article: email authorsupport@elsevier.com