



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
BIOSURFACTANTE ISOLADO DE *Chromobacterium*
violaceum EM MEIOS ALTERNATIVOS E DE BAIXO CUSTO**

ADRIANA ALMEIDA ANTUNES

**RECIFE
2010**

ADRIANA ALMEIDA ANTUNES

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
BIOSSURFACTANTE ISOLADO DE *Chromobacterium*
violaceum EM MEIOS ALTERNATIVOS E DE BAIXO CUSTO**

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

Área: Microbiologia Aplicada

ORIENTADORA: Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI

RECIFE
FEVEREIRO/2010

Antunes, Adriana Almeida

Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo/ Adriana Almeida Antunes. – Recife: O Autor, 2010.

221 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia apêndice e anexos.

1. *Chromobacterium violaceum* 2. Biorremediação 3.
Resíduos industriais I. Título.

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 210

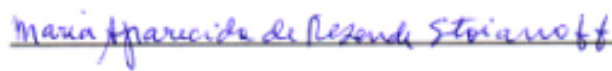
**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
BIOSURFACTANTE ISOLADO DE *Chromobacterium violaceum* EM
MEIOS ALTERNATIVOS E DE BAIXO CUSTO**

ADRIANA ALMEIDA ANTUNES

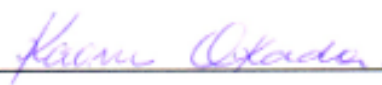
EXAMINADORES:



Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki – UNICAP



Profa. Maria Aparecida Resende Stoianoff – UFMG



Profa. Dra. Kaoru Okada - UNICAP



Profa. Dra. Celuta Sales Alviano - UFRJ



Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão - UFPE

Aos meus pais, Marcelo e
Maria Thereza Antunes, pela
presença constante em minha vida,
pelo incentivo, confiança, paciência
e amor incondicional, dedico.

Aos meus avós Ivone,
Waldemir Antunes (*in memorian*),
Engracia (*in memorian*) e Levy (*in
memorian*) pela compreensão,
apoio, simplicidade, alegria de viver,
doçura no modo de tratar e amor
incondicional aos netos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelos obstáculos vencidos e por todas as provações necessárias para o meu amadurecimento pessoal.

A coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Profa. Dra. Maria Tereza Correia e Profa. Dra. Suely Lins Galdino, aos professores e funcionários do curso em especial, Adenilda Eugênia de Lima pelo carinho.

Aos meus irmãos, Tathyana e Guilherme Antunes e a todos os meus familiares, pela compreensão e carinho.

A minha orientadora, Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pelos ensinamentos, oportunidades, confiança, paciência e carinho transmitidos ao longo desses anos.

Aos meus co-orientadores no exterior Prof. Dr. José Antônio Couto Teixeira e Profa. Dra. Ligia Raquel Marone Rodrigues pela colaboração e ensinamentos dedicados no período de estágio.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira S. J. pela utilização de toda a infraestrutura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais para a realização deste trabalho.

Aos professores do NPCIAMB e da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Profa. Dra. Alexandra Salgueiro, Profa. Dra. Clarissa Albuquerque e Profa. Dra. Kaoru Okada pelos bons momentos de convívio.

Aos professores da Universidade Católica de Pernambuco, Profa. Roziana Jordão, Prof. Edson Gomes e Prof. Valdemir Alexandre pelo suporte e amizade.

Aos professores e técnicos da Universidade do Minho pelo apoio recebido durante o período de estágio, em especial Prof. Dr. Nelson Lima, Prof. Dr. Cledir Santos, Profa. Dra. Isabel Belo e Profa. Dra. Mariana Henriques.

A secretária do NPCIAMB Sônia Maria de Souza e aos técnicos de laboratório Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim dos Santos (*in memorian*) e Andre, pela colaboração.

Aos amigos do NPCIAMB pelo carinho e amizade.

A amiga Rosileide Fontenele pela amizade e suporte final da Tese.

Aos amigos do Laboratório de Fermentações e de Biofilmes da Universidade do Minho, em especial Cristiana Gonçalves, Lucia Simões, Idalina e Suzana pelo carinho.

Aos meus amigos, em especial Marluce Carvalho, Reginete Cavalcanti, Maryelza Costa, Daniel Soares, Claudia Patrícia, Josineide Barros, Amanda Vila Nova, Cristina Dias, Elisabete Dias, Adriana Xavier, Danielle Oliveira, Maria do Carmo Marques, Dionila, Ivonete, Miriam e a todos que me ajudaram de alguma forma, pelo carinho e incentivo.

Aos novos amigos que conheci no período de estágio, Karina Magalhães, Nair Sampaio, Gedsimon Soares, Jean, Solange e Guilliano Dragone, Wendell Albuquerque, Bartolomeu, Bartolomeu Souza e Fábila pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, a Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão, Profa. Dra. Celuta Sales Alviano, Profa. Dra. Maria Aparecida Resende Stoianoff, Profa. Dra. Kaoru Okada, Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão e Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pelas contribuições sugeridas na bancas de Qualificação e Defesa de Tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial a Praveen Sher pelo carinho, paciência, apoio incondicional e principalmente pelos momentos de convivência, contribuindo para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMO	19
1.0 INTRODUÇÃO	21
2.0 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	24
3.1.1 Histórico	24
3.1.2 Características gerais	25
3.1.3 Patogenicidade	26
3.1.4 O pigmento violaceína	28
3.2. Surfactantes: Origem química	32
3.2.1 Surfactantes: Origem microbiana	34

3.2.1.1 Classificação química	36
3.2.1.2 Propriedades fisiológicas	38
3.3 Sistemas de Winsor	39
3.4 Diagrama de fases	40
3.5 Produção de biossurfactantes	41
3.6 Vantagens dos biossurfactantes versus surfactantes convencionais	43
3.7 Substratos alternativos	44
3.7.1 Óleos vegetais e Resíduos de Petróleo	46
3.7.2 Milhocina	46
3.7.3 Glicerina: co-produto do biodiesel	47
3.8 Aplicações industriais	49
3.8.1 Biorremediação	50
3.8.2 Limpeza de reservatórios de óleos	51
3.8.3 Recuperação Melhorando de petróleo (MEOR)	52
3.8.4 Indústrias de alimentos	53
3.8.5 Agricultura	55
3.8.6 Mineração	55
3.8.7 Aplicações terapêuticas	55
3.8.8 Produtos de higiene e cosméticos	56
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ARTIGO 1	75

ARTIGO 2	88
ARTIGO 3	112
ARTIGO 4	134
CONCLUSÕES GERAIS	181
ANEXOS	184

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletromicrografia de <i>Chromobacterium violaceum</i> (www.integral.br/zoom/imgs/246/image001.jpg)	26
Figura 2 - Lesões causadas por <i>Chromobacterium violaceum</i> (www.med.cmu.ac.th/.../sensitivity_plate.jpg)	27
Figura 3 - Aspectos do crescimento de <i>Chromobacterium violaceum</i> (www.doyma.es/.../28v24n07_13091787fig03.jpg)	29
Figura 4 - Estrutura química da violaceína (DURAN et al., 2001)	30
Figura 5 - Estrutura do monômero do surfactante (http://virtuallaboratory.ne)	33
Figura 6 - Estrutura do surfactante e formação de micelas (http://quimicadostensoativos.blogspot.com/2008_11_01_archive.html)	34
Figura 7 - Representação do efeito da concentração de um surfactante (PORTER, 1994).	35
Figura 8 - Classificação de Winsor para Sistemas Microemulsionados (WINSOR, 1948)	40
Figura 9 - Diagrama Pseudoternário com Relação Cotensoativo/Tensoativo Constante	41

Figura 10 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de 43
precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos
como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato
sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose – 1,6 bifosfatase
(SYLDATK e WAGNER, 1987)

Figura 11 - Produção do biodisel a partir da transesterificação de óleo 48
vegetal (www.biodieselbr.com)

Figura 12 - Representação da ação do surfactante sobre uma mancha de 49
óleo (IPIECA, 1993).

ARTIGO 1

Figura 1- Diagrama de Pareto e os efeitos do glicerol, cloreto de sódio,
milhocina e óleo de soja como variáveis independentes sobre a tensão 84
superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*
UCP 1467 sob agitação de 150 rpm

Figura 2- Diagrama de Pareto e os efeitos do glicerol, cloreto de sódio,
milhocina e óleo de soja como variáveis independentes sobre a tensão 85
superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*
UCP 1467 sob condições estáticas

ARTIGO 2

Figura 1 – Antibiógrama realizado em linhagem de *Chromobacterium* 110
violaceum UCP 1552

Figura 2 - Diagrama de Pareto e os efeitos padronizados, utilizando triptona, milhocina e óleo pós-fritura sobre a tensão superficial como variável dependente por *Chromobacterium violaceum* 111

ARTIGO 3

Figura 1 – Diagrama de Pareto de efeitos padronizados, em meio milhocina, lactose e óleo de milho pós-fritura por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando a tensão superficial como variável resposta 129

Figura 2 – Resultado do processo fermentativo determinado pelo índice de emulsificação por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 em óleo de milho 130

Figura 3 – Resultado do processo fermentativo determinado pela atividade emulsificante utilizando óleo de milho e n-hexadecano por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 131

ARTIGO 4

Figura 1 - Curva de crescimento e tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 em meio de produção composto por milhocina e glicerina após 120 horas de cultivo. 164

Figura 2 - Concentração Micelar Crítica-CMC do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* após 120 horas de cultivo em meio composto por milhocina e glicerina 165

Figura 3- Comprovação da produção extracelular do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*, UCP 1463, avaliado pela tensão superficial do líquido metabólico, da condição selecionada do planejamento.LM1 (controle), LM2 (líquido metabólico com células de *Chromobacterium violaceum*), LM3 (líquido metabólico livre de células) e LM4 (líquido metabólico após extração do biossurfactante)

Figura 4 - Estabilidade do biossurfactante determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463. (A) diferentes valores de pH; (B) diferentes temperaturas (C) diferentes concentrações de NaCl

Figura 5 - Espectrometria ao raio infravermelho (IV) do biossurfactante extraído de *Chromobacterium violaceum* UCP (1463) através da precipitação com sulfato de amônio pré-purificado pela diálise

Figura 6 - Espectrometria ao raio infravermelho (IV) do biossurfactante extraído de *Chromobacterium violaceum* UCP (1463) através da acidificação do líquido metabólico livre de células, com ácido clorídrico pré-purificado com clorofórmio-metanol

Figura 7- Superfície de resposta na produção de biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 formulado por diferentes concentrações de milhocina e glicerina determinado pela tensão superficial

Figura 8 – Curvas de contorno na produção de biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 formulado por diferentes concentrações de milhocina e glicerina determinado pela tensão superficial 171

Figura 9 - Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 com 72 horas de cultivo 172

Figura 10 – Efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 com 72 horas de cultivo 173

Figura 11 – Isolamento e pré-purificação do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463. A – biossurfactante bruto isolado por acidificação; B – biossurfactante pré-purificado com a utilização de solvente (clorofórmio – metanol); C – biossurfactante bruto isolado por precipitação com sulfato de amônio; D – biossurfactante pré-purificado através da diálise. 174

Figura 12 – Aplicação do biossurfactante em solo arenoso adsorvido com óleo queimado de motor por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463. A – solo arenoso adsorvido com óleo queimado de motor; B – Remoção do óleo queimado em água destilada; C – remoção do óleo queimado de motor com o líquido metabólico, após 48 horas de cultivo. 175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores (MUTHUSAMY et al., 2008) 37

Tabela 2- Matéria prima de baixo custo utilizada para a produção de biossurfactante (MUKHERJEE et al., 2006) 45

Tabela 3- Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina (MENEGASSI, 2007) 47

Tabela 4- Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes (BANAT et al., 2000) 50

ARTIGO 1

Tabela 1- Matriz do planejamento fatorial de 2^3 com 4 repetições no ponto central aplicado para avaliar a produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* 81

Tabela 2- Avaliação da tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*, UCP 1467 e UCP 1489, utilizando diferentes substratos, após 72 de fermentação, sob condições de agitação e estática 82

Tabela 3- Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum*, UCP 1489, na condição selecionada (milhocina, glicerol e óleo de soja) em 24, 48 e 72hs, sob agitação 83

ARTIGO 2

Tabela 1 – Resultados dos testes fermentativos e bioquímicos da *Chromobacterium violaceum* UCP 1552 107

Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados por *Chromobacterium violaceum* UCP 1552 108

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial de 2^3 , com quatro pontos centrais, utilizando diferentes concentrações de triptona, milhocina e óleo pós-fritura, sobre as variáveis respostas tensão superficial e índice de emulsificação por nova linhagem de *Chromobacterium violaceum* UCP 1552 109

ARTIGO 3

Tabela 1 – Valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central 132

Tabela 2 – Matriz decodificada do planejamento fatorial de 2^3 e os resultados da tensão superficial nos meios de produção 133

ARTIGO 4

Tabela 1 - Níveis e fatores do DCCR aplicado 176

Tabela 2 - Matriz de planejamento e variáveis respostas para o DCCR aplicado do planejamento fatorial de 2^2 177

Tabela 3 - Resultado do processo fermentativo de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 utilizando planejamento experimental (DCCR) de 2^2 com 4 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo, tendo como variável resposta a tensão superficial e a atividade de emulsificação 178

Tabela 4 - Resultado do processo fermentativo de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 utilizando planejamento experimental (DCCR) de 2^2 com 4 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo, tendo como variável resposta o índice de emulsificação utilizando diferentes substratos hidrofóbicos 179

Tabela 5 - Análise da variância dos dados experimentais para tensão superficial 180

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC- American Type Culture Collection

CSL – Corn steep liquor

CLSI - The Clinical and Laboratory Standards Institute

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento de Conselho Científico e Tecnológico

CMC – Concentração Micelar Crítica

DCCR- Delineamento Composto Central Rotacional

E₂₄ – Emulsificação por 24 horas

HHLs - N-hexanoil homoserina lactona

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

MEOR – Microbial Oil Recovery Enhancement

TS – Tensão superficial

UFC – Unidade formadora de Colônia

UAE- Unidade de Atividade Emulsificante

O/A – Emulsificação do tipo óleo em água

A/O – Emulsificação do tipo água em óleo

Mn/m- milinilton/metro

Resumo

Os surfactantes ou tensoativos são moléculas anfifílicas que possuem ação superficial devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos numa mesma molécula apresentando a capacidade de atuar na interface de compostos de diferentes naturezas. O interesse em surfactantes de origem microbiana tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente devido ao seu potencial de aplicação industriais e ambientais. Neste trabalho, foi investigado o potencial de cinco linhagens de *Chromobacterium violaceum* (UCP 1467, UCP 1489, UCP 1552, ATCC 12472 e UCP 1463), isolados de solo e água, na produção de biossurfactantes em meio de produção constituído por resíduos industriais como substratos alternativos de baixo custo. Os efeitos das concentrações dos componentes do meio de produção foram investigados através do planejamento fatorial completo com todas as linhagens de *C. violaceum*. A linhagem de *C. violaceum* UCP (1463) demonstrou melhores resultados referente à máxima produção do biossurfactante, evidenciada pelo alcance da redução da tensão superficial da água de 72 mN/m para 26,7 mN/m, em meio formulado com milhocina (0,3%) e glicerina (0,782%), através de um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) após 72 horas de cultivo. O biossurfactante bruto, obtido pelo método de isolamento através da precipitação com sulfato de amônio, com posterior diálise da amostra, mostrou-se mais eficiente devido à reduzida quantidade de impurezas no biopolímero, constatadas pela coloração esbranquiçada do biossurfactante. Este biopolímero extracelular, produzido por esta mesma linhagem, foi caracterizado como aniônico, apresentando um valor da concentração micelar crítica (CMC) de 1,5% e capacidade de emulsificação (E_{24}) de 100% utilizando óleo queimado de motor com atividade emulsificante de 6 U.A.E. Verificou-se a presença dos grupamentos éster e ácido carboxílico no biossurfactante selecionado de *C. violaceum* UCP (1463), sendo caracterizado como polimérico devido a alta composição em carboidratos, lipídeos e proteínas, além de apresentar efetiva estabilidade em todas as faixas de pHs, estabilidade térmica em todas as temperaturas testadas como também, estabilidade nas

concentrações de 8 e 10% de NaCl. O potencial do biossurfactante produzido pela linhagem de *C. violaceum* UCP (1463), em meio constituído por resíduos industriais, foi comprovado pela eficiência deste biopolímero na remoção de óleo queimado de motor adsorvido em solo arenoso, removendo 86% deste óleo adsorvido, indicando desta forma, seu potencial em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chaves: *Chromobacterium violaceum*, biossurfactante, resíduos industriais, biorremediação.

1.0 INTRODUÇÃO

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa encontrada no meio ambiente como saprófita, em uma grande variedade de ecossistemas tropicais e subtropicais, principalmente em água e solo (DURAN; MENCK, 2001). É uma β -proteobactéria de grande interesse biotecnológico devido ao seu amplo potencial para uso industrial, farmacológico e ecológico (CAREPO et al., 2004). Esta bactéria de vida livre apresenta uma grande habilidade para sobreviver nos mais diversos ambientes e foi escolhida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), como modelo para ser o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente sequenciado, por meio de consórcio de laboratórios de âmbito nacional (VASCONCELOS et al., 2003).

De acordo com as pesquisas realizadas por Creczynski-Pasa e Antônio (2004), *C. violaceum* não é considerada uma bactéria exigente. Em condição aeróbia, é capaz de crescer em meios com carboidratos simples, como a glicose, frutose, galactose e ribose, utilizando as vias de Embden-Meyerhoff, ciclos de Krebs e do glioxilato. Em condições de anaerobiose, a bactéria metaboliza glicose, produzindo ácidos, acético e fórmico, mas não produz ácido láctico nem etanol. *C. violaceum* é capaz, ainda, de utilizar aminoácidos e lipídios como suplementos energéticos. Apesar do seu potencial biotecnológico, poucos estudos vêm sendo realizados para verificar sua capacidade na produção de biossurfactantes.

Biossurfactantes são produzidos por diversos microrganismos e podem apresentar diferentes estruturas químicas com propriedades tensoativas, cuja estrutura inclui um radical hidrofílico composto de aminoácidos ou peptídeos; ânions ou cátions; mono-, di- ou polissacarídeos e um radical hidrofóbico, frequentemente constituído de ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados (GEORGIOU et al., 1992). Essa diversidade leva à inferência de que diferentes grupos de biossurfactantes possuem diferentes papéis naturais no crescimento dos microrganismos produtores (RON; ROSENBERG, 2002).

Os biossurfactantes apresentam propriedades de biodegradabilidade e baixa toxicidade constituindo vantagens adicionais sobre os surfactantes

sintéticos e, conseqüentemente, tornando-se substitutos dos emulsificantes químicos convencionais. Desta forma, os biossurfactantes são considerados moléculas com grande aplicação no mercado pelo fato desses produtos serem considerados naturais, além de apropriados para aplicação ambiental (LIN, 1996; BANAT et al., 2000).

No entanto, até o momento, poucos biossurfactantes têm sido usados em nível industrial por falta de processos economicamente viáveis para a produção, extração e purificação. Assim, a prospecção na busca de microrganismos produtores de biossurfactantes em escala industrial, utilizando processos e substratos de baixo custo, continua sendo objetivos de um grande número de investigações.

Neste sentido, investigações foram realizadas visando à produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum*, objetivando novas moléculas em meios de produção de baixo custo, bem como, um processo de extração para o mesmo, visando aplicação em solos contaminados por petróleo e ou derivados.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar vários substratos de origem agroindustriais (óleos de soja, canola, milho, babaçu in natura e pós-fritura e milhocina) de baixo custo e o rejeito do excedente da produção do Biodisel, glicerina, na produção de biossurfactante por linhagem de *Chromobacterium violaceum*, utilizando planejamento fatorial completo, bem como aplicação em solo contaminado por óleo queimado de motor.

2.2 Específicos

- Selecionar a linhagem de *C. violaceum* com maior produção de biossurfactante em meios de baixo custo;
- Investigar, através de um planejamento fatorial os substratos óleo de soja, canola, milho, babaçu, milhocina e glicerina no aumento da produção de biossurfactante por *C. violaceum*;
- Otimizar a produção de biossurfactante por *C. violaceum* a partir da linhagem e condições selecionadas, tendo como variável resposta tensão superficial e atividade de emulsificação;
- Realizar a cinética de crescimento da linhagem selecionada de *C. violaceum* e acompanhar a produção de biossurfactante nas condições e meio de cultivo otimizado;
- Investigar a estabilidade do biossurfactante produzido pela linhagem selecionada de *C. violaceum* quando submetido a diferentes temperaturas, concentrações de NaCl e pH;
- Isolar, caracterizar e avaliar a eficiência do biossurfactante produzido por *C. violaceum* na remoção de óleo queimado de motor em solo contaminado;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Chromobacterium violaceum*:

3.1.1. Histórico

Chromobacterium violaceum foi descrita pela primeira vez no século XIX por Boisbaudran em 1882, evidenciando a formação de uma coloração violeta sobre um preparado à base de arroz, que o autor atribuiu a um “pequeno organismo” (BOISBAUDRAN, 1882). Em 1967, De Moss definiu o “pequeno organismo” e o pigmento descrito por Boisbaudran, como sendo provavelmente *Chromobacterium violaceum* e a violaceína, respectivamente, devido ao espectro de absorção de luz visível (DEMOSS, 1967). De forma independente, em 1880, Bergonzini fez uma descoberta acidental, enquanto trabalhava com soluções de ovoalbumina na Universidade Modena na Itália. Ele havia preparado, em março de 1880, muitas soluções de albumina de ovo para estudar o mecanismo de retardamento da putrefação, e neste experimento, esqueceu de descartar uma das soluções que servia de controle, ocorrendo o posterior aparecimento de um filme. O pesquisador italiano reduziu o volume por evaporação e obteve uma solução de um fino filme muito denso de cor violeta. No início, se pensava ser a *Cromococcus violaceus*, que era a única bactéria conhecida que apresentava coloração violeta, mas, percebeu que se tratava de outra bactéria. Após alguns experimentos, Bergonzini denominou de *Cromobacterium violaceum*, publicando sua descoberta “sobre uma nova bactéria colorida” (BERGONZINI, 1881). Em seguida, Zimmerman corrigiu a ortografia de *Cromobacterium* para *Chromobacterium violaceum*, (BUCHANAN, 1918; ZIMMERMAN, 1881; BALOWS et al., 1991). Entretanto, por um longo período a *Chromobacterium violaceum* foi chamada de *Baccilus violaceus* (TOBIE, 1934). Desde 1984, o gênero foi descrito por Sneath, é encontrado no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey’s (HOLT; FRIEG, 1984).

No Brasil, a *C. violaceum* só foi relatada quase um século depois. Em abril de 1976, na frente da estação de tratamento de água da cidade de Manaus (Amazonas) a partir de uma amostra de água proveniente de uma

profundidade de 30 metros. O objetivo era realizar uma análise bacteriológica, e os resultados indicaram a existência de apenas dois tipos diferentes de colônias bacterianas: colônias brancas e violetas. As violetas foram identificadas pelo Professor Wilson Chagas de Araújo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, como sendo a *C. violaceum*, sendo esta a primeira vez que se isolou e se estudou esse microrganismo no Brasil (CALDAS, 1977; CALDAS et al., 1978). A violaceína foi considerada como um pigmento protetor da irradiação solar para a bactéria, por sugestão do Professor Caldas, originando assim, uma série de estudos, que evidenciaram o potencial fototerapêutico dessa substância (DURAN; FALJONI-ALARIO, 1980; CALDAS, 1990; DURAN, 1990).

Em 2000, a bactéria *C. violaceum*, foi escolhida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) para ser o primeiro microrganismo a ter o seu genoma completamente sequenciado, devido ao seu potencial biotecnológico. A sequência completa do seu genoma foi finalizada em 2002 e publicada em 2003 no relatório final do BRAZILIAN GENOMA PROJECT CONSORTIUM (VASCONCELOS et al., 2003).

3.1.2. Características Gerais

C. violaceum é um bacilo Gram-negativo, móvel, anaeróbio facultativo pertencente à família Neisseriaceae (GARRITY; HOLT, 2001, GRIER et al., 2004). As colônias são convexas e/ou planas, não gelatinosas e apresentam uma coloração violeta, embora variantes possam ser irregulares e não-pigmentadas (SILVENDRA; TAN, 1977; TRABULSI, 1999; KONEMAN, 2001; RAY et al., 2004; HUNGRIA et al., 2004).

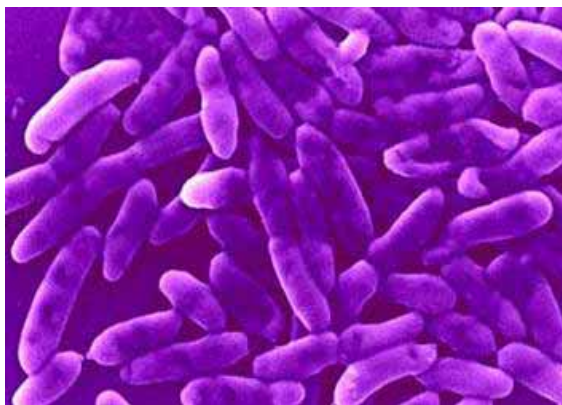


Figura 1 - Eletromicrografia de *Chromobacterium violaceum* (foto: Márcia Attias/UFRJ) www.integral.br/zoom/imgs/246/image001.jpg;

3.1.3. Patogenicidade

O potencial patogênico da *C. violaceum* foi descrito pela primeira vez em 1905 por Wooley, quando a mesma foi identificada como responsável pela morte de búfalos por septicemia, nas Filipinas (WOOLEY, 1905). Posteriormente, verificou-se que a bactéria poderia causar infecções em outros animais, como porcos, macacos, ovelhas e cães (TI et al., 1993; CHONG; LAM, 1997; DURAN et al., 2001; CHATTOPADHYAY et al., 2002) e em 1927, na Malásia, foi descoberto como patógeno humano (SNEATH et al., 1956).

C. violaceum é um patógeno oportunista que pode causar infecção tanto em indivíduos saudáveis quanto em imunocomprometidos, especialmente em pacientes com enfermidade granulomatosa crônica (LEE et al., 1999; DIAS et al., 2005; STEINBERG; RIO, 2005).

A violaceína se assemelha ao pigmento verde da *Pseudomonas aeruginosa*, onde ambos são habitantes dos ecossistemas aquáticos e terrestres encontrados em todo o mundo e que se tornou um importante patógeno hospitalar comum, pondo em risco pacientes hospitalizados crônicos. Além da importância clínica e farmacológica, as duas bactérias contribuem para a biorremediação ambiental (FARAMARZI et al., 2004).

Geralmente, a *C. violaceum* se comporta como saprófita, mas esporadicamente torna-se um patógeno oportunista agressivo em humanos e

animais (CROSSE et al., 2006; FOMBUENA et al., 1998; HASSAN et al., 1993; TI et al., 1993), causando septicemia fatal de lesões na pele e abscessos no fígado (SIRINAVIN et al., 2005; TEE et al., 2006; TEOH et al., 2006) e no pulmão (MARTINEZ et al., 2000). Portanto, graves infecções podem ocorrer com uma alta mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (PONTE; JENKINS, 1992; LEE et al., 1999; SHAO et al., 2002; ALVES DE BRITO et al., 2004; ANG, 2004) (Figura 2).



Figura 2 - Lesões causadas por *Chromobacterium violaceum*

www.med.cmu.ac.th/.../sensitivity_plate.jpg

Em todo o mundo, foram reportados mais de 150 casos de infecções causadas por *C. violaceum*, na Argentina (KAUFMAN et al., 1986), Brasil (PETRILLO et al., 1984; MARTINEZ et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2005; SAMPAIO et al., 2005; STEINBERG; RIO, 2005), Cuba (MACHIN et al., 1986), Panamá (RIOS et al., 1985; MARSHALL et al., 1986), Venezuela (DARRICARRERE et al., 1986; PINEDA et al., 2000), Sri Lanka (DAVIES, 1986), Vietnam (BAKER et al., 2008), Taiwan (CHOON-YUK et al., 2007), Japão (DAVIES, 1986), Estados Unidos (SHAO et al., 2002; MOORE; STEPHENS, 2001; STEINBERG; RIO, 2005); Austrália (SHAO et al., 2002; MOORE; STEPHENS, 2001), África (SHAO et al., 2002; MOORE; STEPHENS, 2001), Índia (DAVIES, 1986; CHATTOPADHYAY et al., 2002; RAY et al., 2004; IJAYAN et al., 2008), Malásia (JITMUANG, 2008) e Colômbia (MARTINEZ e MATTAR, 2007).

A maioria dos casos estudados está associado a lesões da pele o contato e exposição ao solo e águas estagnadas (LEE et al., 1999; DIAS et al.,

2002; GRIER et al., 2004; TEOH et al., 2006) e também associados com a ingestão de água contaminada contendo o microrganismo (DROMIGNY et al., 2002; RAY et al., 2004; CHOON-YUK et al., 2007), imersão em tanques (SIQUEIRA et al., 2005; DIAS et al., 2005), peritonites (WATINE et al., 2006), e meningites (MIDANI; RATHORE, 1998; MOORE et al., 2001). As manifestações clínicas apresentam um período de incubação entre 3 e 14 dias, de acordo com o tipo de exposição (DIAS et al., 2005). Geralmente se apresenta como uma infecção localizada no lugar do contato, acompanhada de febre, náuseas, vômitos e dor abdominal intensa, com rápida formação de abscessos múltiplos no fígado, pulmões, rins, sepsis fulminante e óbito (CHANG-HUA et al., 2003; DIAS et al., 2005; TEOH et al., 2006; MIDANI; RATHORE, 1998).

Um grande alerta deve ser criado sobre esta infecção, principalmente, entre os pediatras e cirurgiões-pediatras, uma vez que as crianças se infectam com mais frequência que os adultos, necessitando de uma terapia agressiva para salvar estes pacientes (CHATTOPADHYAY, 2002).

Embora, a sequência completa do genoma de *C. violaceum* tenha revelado sua notável capacidade de adaptação (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003), as estratégias subjacentes à sua adaptabilidade ao ser humano a infecções ainda não tenham sido profundamente investigadas, nos níveis moleculares e genéticos (UROZ et al., 2003).

3.1.4. O pigmento violaceína

C. violaceum é um microrganismo de vida livre, encontrado em amostras de água e solo, em regiões tropicais e subtropicais (MARTINEZ et al., 2000; CHANG-HUA et al., 2003; GRIER et al., 2004; HUNGRIA et al., 2004; STEINBERG; RIO 2005; HUNGRIA et al., 2005), incluindo as margens do Rio Negro, na Amazônia Brasileira, e suas propriedades terapêuticas tem sido objeto de estudo desde a década de 1970 (CALDAS et al, 1978; DURAN et al., 1989; CALDAS, 1990; DURAN; MENCK, 2001; HUNGRIA et al., 2004).

A *C. violaceum* possui uma característica marcante, o pigmento violeta denominado violaceína (ANTONIO; CRECZYNSKI-PASA, 2004; DESSAUX et al., 2004), onde as linhagens podem produzir ou não o pigmento, ainda que as não pigmentadas sejam raras (9%) (SILVENDRA; TAN, 1977; ALVES et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2005). Contudo, os primeiros casos de infecção reportados na Coreia por *C. violaceum* registraram o contato de indivíduos com linhagens não pigmentadas (TRABULSI et al., 1999; LEE et al., 1999) (Figura 3).

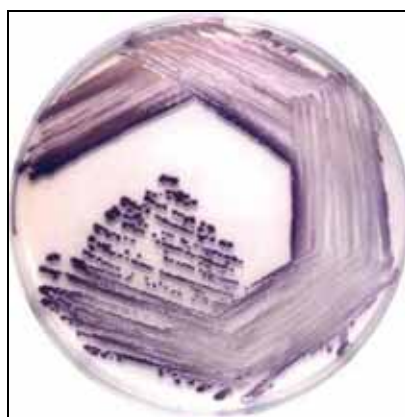


Figura 3 - Aspectos do crescimento de *Chromobacterium violaceum* (GASTON, 2004) (www.doyma.es/.../28v24n0713091787fig03.jpg)

O pigmento, violaceína, é solúvel em etanol e insolúvel em água (YU et al., 1999) e clorofórmio (DIAS et al., 2005), e é constituído por três unidades estruturais: 5-hidroxiindol, 2-pirrolidona e 2-oxoindol (BROMBERG; DURAN, 2001) (Figura 4).

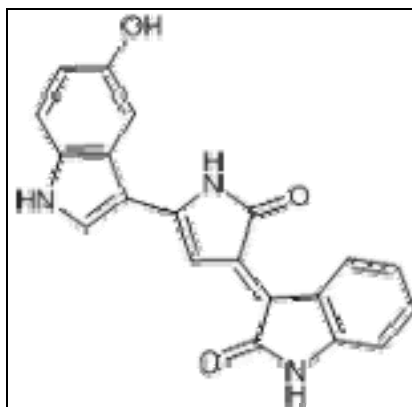


Figura 4 - Estrutura química da violaceína (DURAN et al, 2001)

O potencial biotecnológico da *C. violaceum* e da violaceína destacam-se por apresentar propriedades antibióticas, antitumorais, antiparasitárias e antivirais (DURAN; MENCK, 2001; LEON et al., 2001; DE SOUZA et al., 2002; DIAS JR. et al. 2002; ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2003; MELO et al., 2003; DURAN et al., 2003; DESSAUX et al., 2004).

Suspeitas sobre a ação antibiótica da violaceína foram levantadas a partir da observação da microfauna do Rio Negro, na Amazônia, onde a *C. violaceum* está presente em grande quantidade. Boa parte dos pequenos animais em suas águas é dizimada em virtude do poder antibiótico da violaceína. Diante da baixa disponibilidade de alimentos, os cardumes desaparecem e tornam inviáveis as atividades pesqueiras da população ribeirinha. Não é por outra razão que o rio ficou conhecido internacionalmente como "hungry river" (rio da fome) (<http://inventabrasilnet.t5.com.br/chagas.htm>).

A biomassa do Rio Negro chega a ser 200 vezes menor que a do Rio Amazonas. A *C. violaceum* não é encontrada exclusivamente na região do Rio Negro, como é costume imaginar. Ela se difunde amplamente por todo o mundo tropical e não apenas em ambientes aquáticos (algumas amostras já foram isoladas em solo). Além de violaceína, a *C. violaceum* produz também um peptídeo formado pela união de dois ou mais aminoácidos, como as proteínas e certos hormônios, que revelou expressiva atividade antitumoral em testes feitos com camundongos (SHIRATA et al., 2000).

A violaceína (contendo 10% de desoxiviolaceína) apresentou atividade antiviral, protegendo células hela de infecções do vírus Herpes simples e Pólio (RETTORI, 2000). Mais recentemente, modificações da violaceína (por inclusão com beta-ciclodextrinas) aumentaram a solubilidade desta, que resultaram em atividades antiulcerogênica e antioxidante desses derivados (DE AZEVEDO et al., 2000).

A produção desse pigmento é induzida especificamente pela N-hexanoil homoserina lactona (HHLs) (BLOSSER; GRAY, 2000), que tem sido descrita como regulador genético em várias bactérias Gram-negativas, em um sistema que se denomina “quorum sensing”. Estudos com mutantes que não produzem violaceína provaram que o “quorum sensing” é um mecanismo regulatório gênico comum na maioria das bactérias Gram-negativas (DURAN et al., 2001).

Pesquisas confirmam a presença de vários outros metabólitos importantes. Alguns deles são de grande interesse biológico e médico, como os potencializadores de antibióticos beta-lactâmicos glicopeptídeos, o SQ28,504 e SQ28,546, antibióticos como o aerocianidin, aerocavin e o 3,6-diidroxiindoxazeno (também chamado γ -TO678H, ou 6-hidroxi-3-oxo-1,2-benzisoxazol), monobactama SB-26.180, um antitumoral depsipeptídeo, FR901228, o antibiótico antitumoral WB968, e o inibidor de carboxipeptidase, o arfamenine B. De acordo com Sandor et al., 2000, o FR901228 é um novo inibidor da deacetilase de histona com estrutura diferente de outros mais conhecidos, como tricostatina e trapoxina. Este composto mostra-se com grande potencial terapêutico quando comparado à tricostatina, um inibidor específico de acetilação de histonas, tendo sido descrito como um agente seletivo contra leucemia crônica das células linfocíticas em ensaios clínicos (DURAN et al., 2001).

C. violaceum produz outros metabólitos secundários como algumas enzimas de grande interesse biotecnológico, como é o caso da enzima que catalisa a síntese de gama-ciano-alfa-aminobutírico e tiocianato, triptofano hidroxilase, beta-lactamase serina hidroximetil transferase, glicina liase, betaciano- alanina sintetase, L-triptofano-2', 3'-oxidase, indol oxigenase, quitinase e citosina deaminase (DURAN et al., 2001).

Ressalta-se ainda a capacidade de sintetizar os bioplásticos como o hidroxivalerato e outros polihidroxicanoatos de cadeia curta (FORSYTH et al., 1958; STEINBUCHER et al., 1993, MARTINELLI et al., 2002), bem como a hidrólise de filmes plásticos (GOURSON et al., 1999), na solubilização de ouro (SMITH; HUNT, 1985; CAMPBELL et al., 2001; FARAMARZI et al., 2004), na detoxificação ambiental (CAREPO et al., 2004) e na produção de enzimas quitinolíticas (CHERNIN et al., 1998).

Apesar de seu potencial biotecnológico, poucos estudos vêm sendo realizados com *C. violaceum* para verificar sua capacidade em produzir tensoativos.

3.2. Surfactantes: Origem Química

Os surfactantes constituem uma importante classe de produtos químicos largamente utilizados na indústria moderna, com aplicação na indústria farmacêutica, cosmética, petroquímica e alimentícia (DUARTE et al., 2003), uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos, que apresentam baixa solubilidade em água. São compostos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, e por isso permitem misturar ou dispersar imediatamente como emulsões em água ou outros líquidos (BANAT et al., 2000).

Os tensoativos ou surfactantes são moléculas complexas e possuem uma porção hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico que é fortemente atraído pelo meio aquoso (MULLIGAN, 2005) (Figura 5). Esses metabólitos são moléculas anfifílicas em que as porções polares e hidrofóbicas dependem da fonte de carbono e da espécie bacteriana (BENINCASA et al., 2004).

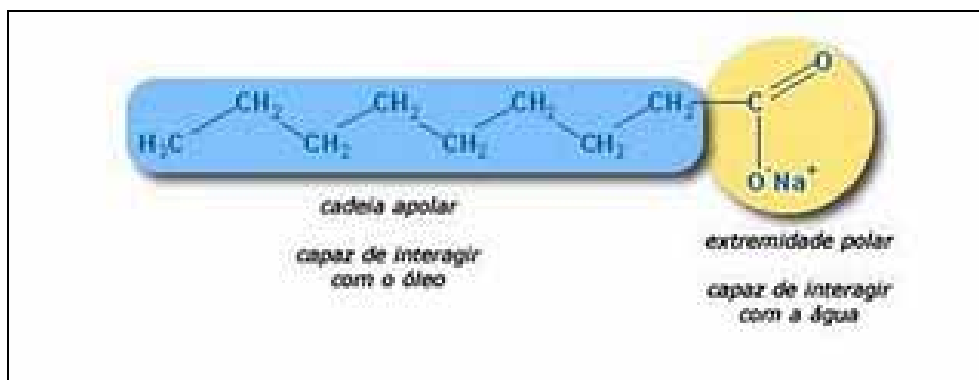


Figura 5 - Estrutura do monômero do surfactante

(<http://www.virtuallaboratory.ne>)

A presença destes dois grupos na mesma molécula (porção hidrofílica e hidrofóbica) facilita a distribuição dos surfactantes nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade. A característica única dos surfactantes deve-se a formação de um filme molecular nas interfaces reduzindo a tensão nesta região (SINGH et al., 2007).

Além disso, surfactantes formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água, e vice-versa (BANAT et al., 2000). A redução da tensão interfacial torna estes compostos adequados para várias aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (KUIPER et al., 2004).

A maioria dos surfactantes comercializados é derivada principalmente da indústria petrolífera, onde também é tóxica ao ambiente, não facilmente degradável e seu processo de produção e seus subprodutos podem ser ambientalmente danosos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002b).

Os rápidos avanços na biotecnologia e o aumento das preocupações com o meio ambiente, combinado a mudanças nas legislações (BANAT et al., 2000), têm aumentado o interesse em surfactantes de origem microbiana, uma vez que possuem como características principais: baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental e a possibilidade de produção utilizando substratos renováveis (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002), além da tolerância à temperatura, pH e força iônica e de serem biodegradáveis no solo e na água (LIN, 1996).

3.2.1. Surfactantes: Origem Microbiana

Biossurfactantes constituem um grupo de metabólitos geralmente secundários com propriedades de reduzir a tensão superficial e interfacial e são sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos (BENINCASA et al., 2004).

As substâncias tensoativas são classificadas em aniônicas (ex: éter sulfonado ou sulfatos), não iônicas ou anfóteras e catiônicas (ex: sais quaternários de amônio), de acordo com a carga exibida pela porção polar da molécula. A parte hidrofóbica é composta geralmente por um hidrocarboneto linear ou ramificado, apresentando ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos. Os íons têm uma forte afinidade pela água devido às atrações eletrostáticas entre a carga do íon e os dipolos da água. Além disso, são capazes de carregar longas cadeias carbônicas (parte apolar) para dentro da solução (GEORGIU et al., 1992; ROCHA, 1999; BANAT et al., 2000; CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; MESQUITA, 2004).

As micelas são definidas como agregados moleculares com regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que espontaneamente se associam em meio aquoso a partir de uma determinada concentração (Concentração Micelar Crítica - CMC). A concentração dessas micelas corresponde a mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. (Figura 6). Quando a CMC é atingida várias micelas são formadas (MULLIGAN, 2005; PIRÔLLO, 2006).

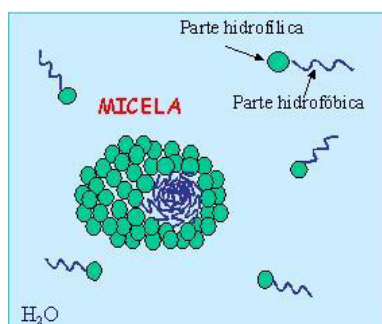


Figura 6 - Estrutura do surfactante e formação de micelas

http://quimicadostensoativos.blogspot.com/2008_11_01_archive.html

A intensidade de adsorção do biossurfactante a superfície depende de sua concentração, ocasionado variação na ordenação destas moléculas sobre a superfície. Em concentrações muito baixa de biossurfactante, o mesmo se distribui na superfície e tende a se orientar paralelamente a esta. Quando ocorre um aumento da concentração de biossurfactante, observa-se a diminuição da área disponível para as moléculas iniciando o processo de ordenação das mesmas a superfície (LIMA, 2007) (Figura 7).

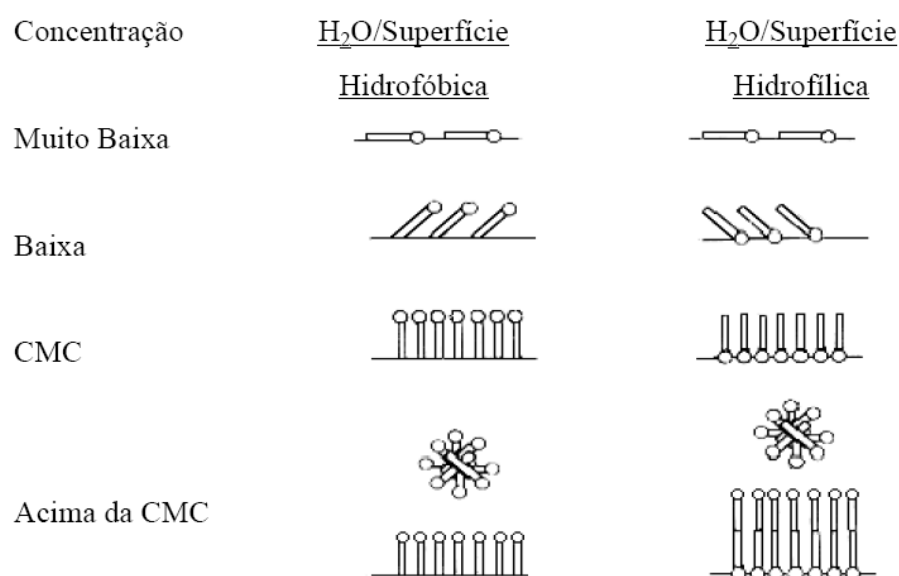


Figura 7 - Representação do efeito da concentração de um surfactante (PORTER, 1994).

Os biossurfactantes também podem ser classificados a partir da sua massa molar:

- Baixa massa molar: os glicolipídeos, que são os mais conhecidos, são formados por carboidratos e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa (ramnolipídeos, trealolipídeos, sofrorolipídeos) e os lipopeptídeos (surfactina, gramicidina S e polimixina) e atuam de forma eficiente na redução da tensão superficial e a tensão interfacial do sistema onde são adicionados.

- Alta massa molar: polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos (emulsans), lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros. Estes são pouco eficientes na redução da tensão superficial, mas envolvem

eficientemente as gotas de óleo e previnem que estas se liguem a outras gotas (RON; ROSENBERG, 2002).

3.2.1.1. Classificação Química

Uma grande variedade de microrganismos produz biossurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons como P, N, Mg, O₂ e Fe⁺² no meio de cultura, além das condições de cultivo (GEORGIU et al., 1992).

Os biossurfactantes possuem moléculas quimicamente diferentes e podem ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros (como os ácidos ustilágico e corinomicólico), além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (ZAJIC et al., 1984; DESAI; DESAI., 1993; BOGNOLO, 1999; LANG, 2002; MAIER, 2003) sendo os lipopeptídeos os biossurfactantes mais efetivos (ZAJIC et al., 1984) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Tipo De Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp</i>
- Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- Treololipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Biossurfactantes poliméricos	
- Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Células	Várias bactérias

Fonte: MUTHUSAMY et al., 2008

A classe dos glicolipídeos compreende um dos grupos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidróxilalifáticos. Nesta classe destacam-se os raminolipídeos que são formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes lipoprotéicos são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo melhor caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus sp*, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina (MAIER, 2003), micosubtilisina e bacilomicina (STELLER et al., 2000). Esse tipo de

composto se caracteriza pela existência de peptídeos ligados a ácidos graxos, sendo que a porção protéica da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos estão freqüentemente dispostos em uma estrutura cíclica (MAIER, 2003).

3.2.1.2. Propriedades Fisiológicas

Além das importâncias comerciais e biotecnológicas, é importante lembrar que os microrganismos produzem biossurfactantes com finalidades fisiológicas. A função fisiológica dos biossurfactantes ainda não está totalmente esclarecida, no entanto, algumas funções têm sido atribuídas a esses compostos:

- Aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é a sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. O elemento chave nesta estratégia são estruturas da superfície responsáveis pela aderência das células às superfícies dos materiais. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede celular para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1999);

- Atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios. Os raminolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* podem atuar como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN et al., 1994).

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (FRANCY et al., 1991; NITSCHKE; PASTORE, 2002);

- Transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Torulopsis tropicalis*, onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002);

3.3. Sistemas de Winsor

Winsor propôs uma classificação que define os vários equilíbrios existentes entre a microemulsão e as fases aquosa e oleosa (WINSOR, 1948). Em função dos equilíbrios, foram estabelecidos quatro sistemas (Figura 8).

Winsor I (WI): É representado pelo equilíbrio entre a fase microemulsão e a fase oleosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da microemulsão a fase óleo, se posiciona acima da microemulsão.

Winsor II (WII): Representa o equilíbrio entre a fase microemulsão e uma fase aquosa em excesso. Devido a microemulsão ser uma mistura de água/óleo/tensioativo e cotensioativo, sua densidade é menor que a da fase aquosa, por isto a mesma se posiciona na parte superior do equilíbrio.

Winsor III (WIII): É definido quando coexistem as três fases em equilíbrio, óleo, microemulsão e aquosa, onde o óleo é a fase superior a microemulsão, a microemulsão a fase intermediária e a fase aquosa a fase inferior.

Winsor IV (WIV): É um sistema em que apenas existe a fase microemulsão, isto é, um sistema monofásico.

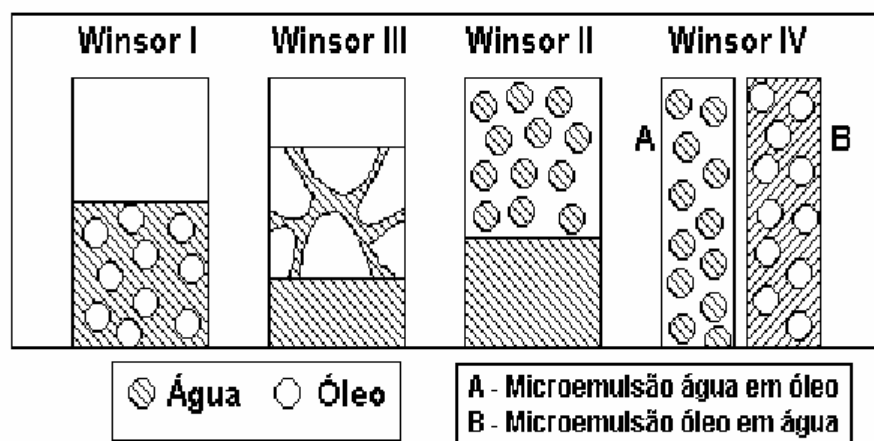


Figura 8 - Classificação de Winsor para Sistemas Microemulsionados (WINSOR, 1948)

3.4. Diagramas de Fases

Os sistemas microemulsionados formados por três ou mais constituintes podem ser representados em diagramas onde, de acordo com as proporções de cada um, pode-se delimitar a região de microemulsão.

Os diagramas ternários representam diretamente sistemas microemulsionados formados por três componentes, ou seja, água, óleo e tensoativo. Sua representação é feita em um diagrama triangular onde cada constituinte puro ocupa um vértice do triângulo. Diagramas de fase quaternários, ou seja, fase aquosa (salina ou não), fase orgânica, tensoativo e co-tensoativo necessitam de uma representação tetraédrica, onde cada vértice representa um componente puro. Estas representações tridimensionais são de difícil construção, visualização e interpretação e, como alternativa, são usados diagramas de fase pseudoternários. Os diagramas pseudoternários são de fácil uso. Os componentes são agrupados e supõe-se que formam pseudoconstituintes puros. Empregam-se normalmente as seguintes relações: relação água-tensoativo constante e a relação tensoativo-cotensoativo constante (Figura 9). A primeira relação é mais utilizada em estudos de difusão de luz e a segunda relação é utilizada quando se deseja estudar o comportamento das fases da microemulsão.

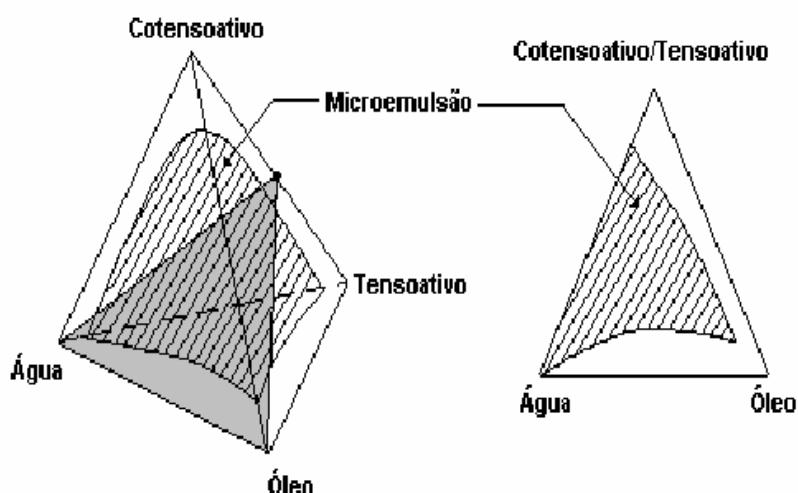


Figura 9 - Diagrama pseudoternário com relação cotensoativo/tensoativo constante.

3.5. Produção de Biossurfactantes

A produção de biossurfactantes pelos microrganismos esta intimamente ligada às condições ambientais e nutricionais fornecidas. Todos os fatores que influenciam o crescimento microbiano afetam também diretamente a produção de biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997; MUKHERJEE; DAS, 2005). Temperatura, pH, agitação, disponibilidade de oxigênio e principalmente a fonte de carbono afetam a produção de biossurfactantes, pelo seu efeito sob o crescimento e as atividades celulares. Dentre as fontes de carbono utilizadas estão os substratos miscíveis em água e os hidrofóbicos, uma vez que são considerados os mais promissores em termos de custos da produção (DESAI; BANAT, 1997).

Alguns fatores devem ser analisados para reduzir custos de produção de biossurfactantes, obtendo uma boa eficiência na conversão da fonte de carbono em produto, pois esta representa uma importante parcela nos custos de produção, assim, microrganismos altamente eficientes devem ser selecionados. A fonte de carbono utilizada deve ser de baixo custo, assim, muitas vezes o principal objeto de estudo são resíduos de processos agrícolas

ou outros processamentos. Os processos de produção devem ser altamente eficientes para minimizar os custos de investimentos, bem como custos operacionais. O processo de extração e purificação também deve ser eficiente, pois em alguns casos pode demandar recursos significativos para atingir a pureza necessária do produto (KOSARIC et al., 1983).

Os biossurfactantes são sintetizados por duas vias metabólicas: a via do hidrocarboneto e a via dos carboidratos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). As vias para a síntese dos dois grupos precursores são diversas, porém a síntese de ambas as partes depende do substrato. Vários estudos indicam que o tipo de meio e as condições de crescimento podem influenciar no rendimento do biossurfactante (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; LANG, 2002).

Quando um hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de precursores diferentes das hexoses) podendo, desta forma, ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos. Para a produção dos sacarídeos a via da gliconeogênese é ativada. Consiste na oxidação dos ácidos graxos via β -oxidação a acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação do acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores do polissacarídeo, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. Entretanto, as reações catalisadas pela piruvato quinase e fosfofrutoquinase-1 são irreversíveis; desta forma, outras enzimas, as quais são exclusivas para gliconeogênese, são requeridas para contornar tais reações. As principais reações são apresentadas na Figura 10, até a formação da glicose 6-fosfato que é a principal precursora dos polissacarídeos, dissacarídeos a serem formados para produção da porção hidrofílica dos glicolipídeos (SYLDATK; WAGNER, 1987).

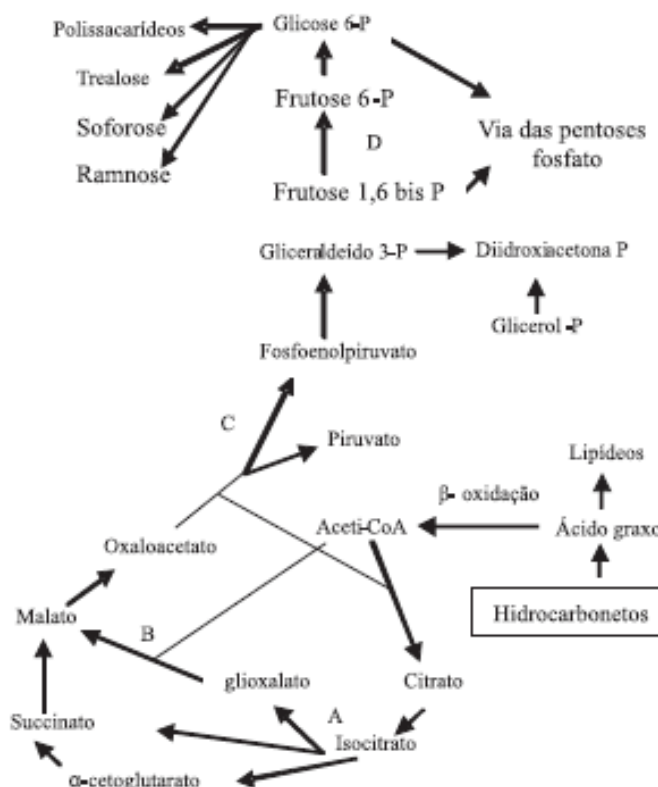


Figura 10 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biosurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose – 1,6 bifosfatase (SYLDATK; WAGNER, 1987).

3.6. Vantagens dos Biossurfactantes versus Surfactantes Convencionais

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais tais como:

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (COOPER; PADDOCK, 1984; BOGNOLO, 1999);

- Mais estáveis quanto as variáveis de temperatura, pH e salinidade, podendo ser utilizados em ambientes com condições extremas (BANAT, 1993; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998; DAS; MUKHERJEE, 2005; ILORI et al., 2005; SEPAHY et al., 2005; ROCHA et al, 2007);
- Biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para uso em biorremediação e tratamento de resíduos (DESAI; BANAT, 1997);
- Específicos, pois a grande diversidade química possibilita a escolha para aplicações específicas (DESAI; BANAT, 1997);
- Possuem baixa toxicidade (SCHIPPERS et al., 2000; MAKKAR; ROCKNE, 2003; EDWARDS et al., 2003);
- Podem ser sintetizados em meio com uso de fontes de carbono renováveis (MAKKAR; CAMEOTRA 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002b; NITSCHKE; PASTORE, 2002; MANEERAT, 2005);
- Apresentam modificações na estrutura química e suas propriedades físicas por meio de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (MULLIGAN; GIBBS, 1989; MUKHERJEE et al., 2006).

3.7. Substratos Alternativos

Segundo Cameotra; Makkar, (1998), o sucesso da produção industrial de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de matérias-primas de baixo custo, uma vez que estas representam entre 10% a 30% do custo total (Tabela 2).

Tabela 2 - Matéria prima de baixo custo utilizada para produção de biossurfactante

Resíduos: matéria prima de baixo custo	Tipo de biossurfactante	Linhagem microbiana
Óleo de canola	Raminolipídeos	<i>Pseudomonas</i> DSM 2874
Óleo de babaçu	Soforolipídeos	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055
Óleo de milho	Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214
Óleo de soja e girassol	Raminolipídeos	<i>P. aeruginosa</i> DS10-129
Óleo de girassol	Lipopeptídeos	<i>Serratia marcescens</i>
Óleo de soja	Manosileritritol	<i>Candida</i> sp. SY16
Óleo residual de fritura	Raminolipídeos	<i>P. aeruginosa</i> 47T2
Óleo de soja	Raminolipídeos	<i>P. aeruginosa</i> LBI
Óleo de girassol	Raminolipídeos	<i>P. aeruginosa</i> LBI
Resíduo de refinaria de óleo	Glicolipídeos	<i>C. antarctica</i> e/ou <i>C. apicola</i>
Óleo de soja	Raminolipídeos	<i>P. aeruginosa</i> AT10
Resíduo agroindustrial		<i>P. aeruginosa</i> BS2
soro de leite	Raminolipídeos	
Efluente de		<i>Bacillus subtilis</i>
processamento de batata	Lipopeptídeo	
Efluente de		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC
processamento de	Lipopeptídeo	21332 e <i>B. subtilis</i> LB5a
mandioca		

Fonte: MUKHERJEE et al.; 2006.

Existe uma grande dificuldade na seleção de um resíduo com a composição adequada de nutrientes que permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse. Em geral, substratos agroindustriais que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos, suprem a necessidade de fonte de carbono, para a produção de biossurfactantes.

A produção de biossurfactantes por bactérias é bastante influenciada pela fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentração de fósforo e cátions

multivalentes. A razão C/N (carbono/nitrogênio) representa um fator extremamente importante na etapa de otimização do meio de cultivo, bem como a razão C/P (carbono/fósforo).

O estabelecimento de um processo biotecnológico a partir desses substratos alternativos também apresenta outra dificuldade, que é a padronização devido às variações naturais de composição, bem como os custos de transporte, armazenagem e tratamentos prévios necessários. Entretanto, a utilização de resíduos pode diminuir os custos da produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento (MERCADE; MANRESA, 1994; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999a, MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

3.7.1 Óleos Vegetais e Resíduos de Petróleo

Pesquisas realizadas com óleos derivados de plantas têm demonstrado que elas podem atuar de forma eficaz como matérias-primas baratas para produção de biossurfactantes, como por exemplo, óleos de babaçu, milho (VANCE-HARROP et al., 2003; PEKIN et al., 2005), girassol e soja por diversos microrganismos (RAHMAN et al., 2002; KIM et al., 2006). Além dos óleos vegetais *in natura*, também foram relatados óleos vegetais reutilizados de refinarias e da indústria alimentar como bons substratos para a produção de biossurfactantes (HABA et al., 2000; TRUMMLER et al., 2003; NITSCHKE et al., 2005).

3.7.2 Milhocina

A milhocina é um subproduto da maceração no processo de moagem da indústria do amido de milho – CSL (*corn steep liquor*). É viscoso, de cor marrom escura e apresenta pH ácido. Segundo Filipovic et al., (2002), a milhocina tem sido relatada como uma fonte alternativa de proteína, energia e minerais para os animais. O produto é praticamente livre de fibras de gordura,

silica e contém de 20-25% de ácido láctico (WAGNER et al., 1983; TALPADA et al., 1987; GUPTA et al., 1990) (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Aminoácidos		Vitaminas		Minerais	
	(%)		(mg/kg)		mg/kg (%)
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio	0,14
Arginina	3,68	Cholina	3.500,0	Cobre	15,0
Á aspártico	5,82	Inositol	6000,0	Ferro	100,0
Cisteína	2,20	Niacina	80,0	Manganês	20,0
Ac glutâmico	18,07	Piridoxina	9,0	Manganês	0,60
Triptófano		Riboflavina	6,0	Potássio	2,80
Glicina	5,27	Tiamina	3,0	Sódio	0,10
Histidina	3,72	Ácido	15	Fósforo	1,18
		Pantotêmico			
Isoleucina	3,07			Selênio	0,3
Leucina	8,28			Zinco	60,0
Lisina	4,75			Enxofre	0,60
Tirosina	3,09				
Metionina	1,98				
Fenilalanina	2,85				
Prolina	9,64				
Serina	5,18				
Treonina	4,08				

Fonte: MENEGASSI, 2007

3.7.3 Glicerina - Co-produto do Biodiesel

O biodiesel é produzido, primariamente, por alcoólise de triglicerídeos com metanol ou etanol. As matérias-primas para a produção de biodiesel são oleaginosas, tais como, algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja, bem como, óleos de descarte, gorduras animais e óleos de fritura. Após o período de decantação de 24 horas, obtém-se uma fase óleo, constituída por ésteres alquílicos (metílicos ou etílicos), e uma fase glicerínosa,

constituída por glicerol ou glicerina, principalmente, sabões, álcool (metanol ou etanol), hidróxidos, ácidos graxos e ésteres alquílicos, sendo a composição destes últimos do tipo de oleaginosa utilizada (ASHBY et al., 2006).

A cadeia produtiva do biodiesel gera como principais subprodutos a glicerina, a lecitina, o farelo e a torta da oleaginosa (RATHMANN et al., 2006).

A proporção entre esses componentes é dependente do processo de transesterificação e da eficiência da separação do biodiesel (ASHBY et al., 2006). A Figura 11 apresenta um fluxograma deste processo.

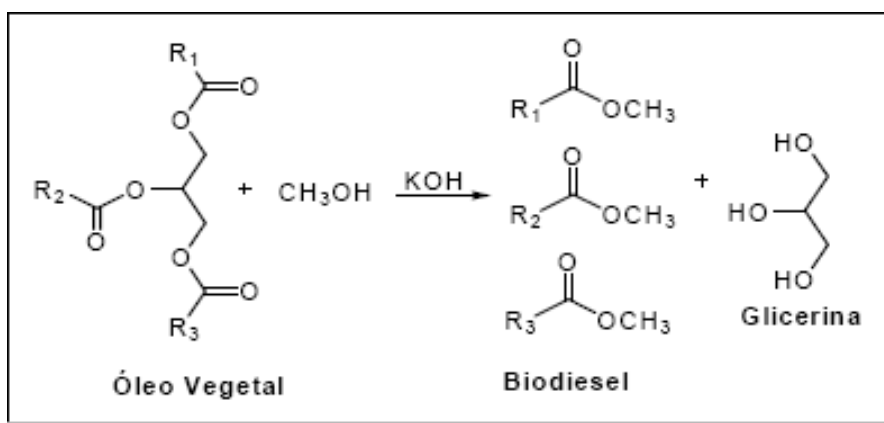


Figura 11 - Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal (www. Biodieselbr.com)

A glicerina é normalmente utilizada na preparação de diversos produtos tais como remédios, produtos de uso pessoal, comida, bebida, tabaco, resinas alquílicas, poliol – polieter, celofane e explosivos, todavia o seu uso é condicionado ao seu grau de pureza, que deve estar usualmente acima de 95% (FERRARI et al., 2005).

A glicerina obtida a partir da reação de formação de biodiesel (transesterificação) geralmente apresenta as seguintes impurezas: água, catalisador (alcalino ou ácido), álcool (não reagido), impureza provinda dos reagentes, ácidos graxos, ésteres, propanodióis, monoéteres, oligômeros de glicerina e polímeros. Estas impurezas variam em função da natureza do óleo vegetal, que é influenciada pela região de cultura e tipo de matriz vegetal, como dendê, mamona, soja, pinhão manso e algodão (PINTO et al., 2005; FERRARI et al., 2005).

A glicerina constitui uma fonte de matéria-prima para produtos de alto valor agregado, como polímeros, obtidos através de conversão química (rotas fermentativas) e aditivos para combustíveis como ésteres e éteres de glicerina, e também se apresentam como fonte alternativa rentável para este co-produto (KARIMEN et al., 2006).

O seu processo de purificação é realizado através de destilação sob pressão reduzida, resultando em um produto límpido e transparente, denominado glicerina destilada ou bidestilada (ÁVILA FILHO et al., 2006).

3.8 Aplicações Industriais

A indústria petrolífera representa o maior mercado para os biossurfactantes, onde são utilizados na etapa da produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (VAN DYKE et al., 1991; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação de petróleo (Figura 12).

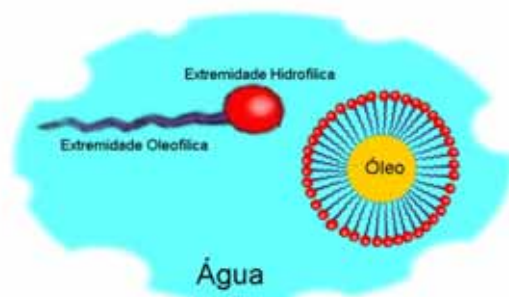


Figura 12 - Representação da ação do surfactante sobre uma mancha de óleo (IPIECA, 1993).

Grande parte dos biossurfactantes produzidos (400-500 toneladas/ano) é usada nas aplicações relacionadas ao petróleo (BOGNOLO, 1999). Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (Tabela 4).

Tabela 4 - Funções e aplicações industriais dos surfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos

Fonte: BANAT et al., 2000

3.8.1 Biorremediação

A biorremediação é uma opção que oferece a possibilidade de eliminar ou transformar vários contaminantes em compostos menos prejudiciais usando a atividade biológica natural. Alta diversidade, adaptabilidade genética e especialização de comunidades microbianas fazem destes organismos um bom instrumento para esta biotecnologia (VIDALLI, 2001). Entretanto a degradação eficiente dos poluentes pode ocorrer de maneira lenta ou mesmo parcial. Nestes casos, a estimulação da atividade microbiana e o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados tem um papel fundamental na otimização do processo (URGUN-DERMITAS et al., 2006).

A poluição de ambientes marinhos por óleo é um problema que vem sendo solucionado com o uso de dispersantes químicos ou por remoção física do óleo das praias e da superfície do mar (IQBAL et al., 1995). Quando o óleo se espalha no ambiente aquático, os hidrocarbonetos de baixo peso molecular são volatilizados e os componentes polares são dissolvidos na água. Em razão da baixa solubilidade do óleo (<1ppm), a maior parte dos componentes permanece na superfície aquática (KARANTH et al., 1999). Os mecanismos primários de remoção dos hidrocarbonetos são a foto oxidação, a evaporação e a degradação microbiana (BOGNOLO, 1999).

O uso de biossurfactantes para remover óleo de solo e de ambientes aquáticos contaminados foi demonstrado usando alguns grupos de biossurfactantes purificados, a exemplo de surfactina, produzida por *B. subtilis*, que é um dos mais efetivos biossurfactantes e potencialmente produzido *in situ* e ramnolipídeos de *P. aeruginosa*, que têm sido o foco de muitos estudos, por reduzirem significativamente a tensão superficial e serem produzidos comercialmente (MULLIGAN et al., 2001).

3.8.2 Limpeza de reservatórios de óleos

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões O/A, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão (BANAT et al., 1991; MULLIGAN, 2004). Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). A utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (BANAT et al., 1991).

3.8.3 Recuperação Melhorada do Petróleo (MEOR)

A MEOR (Microbial Oil Recovery Enhancement) consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (BANAT, 1995). Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo (BANAT, 1995).

O mecanismo de MEOR *in situ* deve-se provavelmente a múltiplos efeitos dos microrganismos no ambiente e no óleo. Estes efeitos incluem: formação de gás e aumento da pressão; produção de ácido e degradação da matriz calcárea; redução na viscosidade do óleo e da tensão interfacial pela produção de biossurfactantes; produção de solventes; degradação de macromoléculas do óleo, resultando em diminuição da viscosidade; bloqueio seletivo da biomassa nas zonas de alta permeabilidade (JACK, 1988; KHIRE; KHAN, 1994).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subsequente propagação *in situ*; ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfactantes; ou, ainda, a produção de biossurfactantes em reatores e posterior injeção no reservatório (BANAT, 1995). A última estratégia é mais cara devido à necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfactante (MOSES, 1987). As outras requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de biossurfactantes (BANAT et al., 2000).

Processos industriais e ambientais estão freqüentemente associados a condições extremas de temperatura, pressão, força iônica, pH e presença de solventes orgânicos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; KHIRE; KHAN, 1994 apud CASTRO, 2005). Isso ocorre em função da necessidade de uma avaliação do comportamento desses compostos para que sua utilização seja viabilizada

(CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999; COSTA, 2005; BARROS, 2007; BARROS et al., 2007). Segundo Jenneman et al., (1983), muitos microrganismos adaptados a condições extremas, com capacidade para recuperação de óleo cru têm sido isolados e estudados.

3.8.4 Indústria de Alimentos

A propriedade de formação e estabilização de emulsões é a principal característica a ser influenciada pela adição de biossurfactantes em alimentos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BANAT et al., 2000; COSTA, 2005; CARILLO et al., 2003; NITSCHKE et al., 2004; VELIKONJA; KOSARIC, 1993).

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase (KLUGE et al., 1988) e na solubilização de aromas (WATERS, 1991) e são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tenso-ativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (OKUMURA et al., 1992). O bioemulsificante produzido por *C. utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (SHEPPARD et al., 1991).

Uma emulsão consiste em um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) em forma de pequenas gotas, com o diâmetro que, em geral, excede 0,1µm (KACHHOLZ; SCHINGMANN, 1987). Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes sólidos finamente divididos (VELIKONJA; KOSARICK, 1993; BERNHEIMER; AVIGAD, 1970), que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre as duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras estéricas e eletrostáticas (BERNHEIMER; AVIGAD, 1970). Exemplos de emulsões naturais são o leite e a gema de ovo. Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, são: creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, sorvetes, bolos, chocolate, recheios (VELIKONJA; KOSARICK, 1993) e produtos instantâneos (KACHHOLZ; SCHINGMANN, 1987).

Algumas vantagens da aplicação de biossurfactantes em alimentos podem ser citadas: estes compostos podem ser produzidos sob aplicação de procedimentos relativamente simples e baratos; novos tipos de surfactantes, que não são facilmente sintetizados por processo químico, podem ser obtidos; possuem um aspecto ecologicamente correto, devido à sua completa biodegradabilidade; para aplicações específicas, diferentes propriedades do mesmo composto podem ser utilizadas (como a combinação do efeito emulsificante com antibiótico) (HAFENBURG et al., 2003), bem como seu potencial para utilização como ingrediente com propriedades funcionais (KIM et al., 1997).

A manoproteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode estabilizar emulsões água/óleo para produção de maionese, biscoitos, bolos, produtos cárneos (salsichas), sorvetes, entre outros. É produzida através de um processo biotecnológico simples, de larga escala e baixo custo. Além de ser estável em uma larga faixa de pH, seu subproduto pode ser utilizado para alimentação animal ou produção de meios de cultura (TORABIZADEH et al., 1996; BANAT, 2000).

As leveduras *Candida utilis*, *Candida valida*, *Hansenula anomala*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Rhodotorula graminis*, a alga vermelha *Porphyridium cruentum* e as bactérias *Klebsiella* sp. e *Acinetobacter calcoaceticus* foram identificadas como bons produtores de bioemulsificantes extracelulares, com melhor atividade estabilizante que a goma arábica e a carboximetilcelulose. O biossurfactante produzido por *Candida utilis*, aplicado como emulsificante em molhos para salada, mostrou-se promissor para ser investigado como novo ingrediente para indústria de alimentos (SHEPORD et al., 1995).

Em detrimento às propriedades da surfactina, relatos de sua aplicação na indústria de alimentos são escassos. Contudo, relata-se que um surfactante produzido por linhagem de *B. subtilis*, utilizando solução de 1,0 mg/mL de produto bruto em água, demonstrou capacidade de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis, por ex., óleos de buriti (*Mauria flexuosa*), maracujá (*Passiflora alata*), cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), babaçu (*Attalea speciosa*), linhaça (*Linum usitatissimum*), castanha do Pará (*Bertholetia excelsa*), palma

(*Elaeis guineensis dura*), soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annus*), canola (*Brassica napus*) e oliva (*Olea europaca*) (COSTA, 2005).

3.8.5 Agricultura

Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas (LIN, 1996). Biossurfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis (PATEL; GOPINATHAN, 1986).

Os raminolipídeos possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (STANGUELLINI; MILLER, 1997).

3.8.6 Mineração

Biossurfactantes produzidos por culturas de *Pseudomonas sp.* e *Alcaligenes sp.* foram utilizados para flotação e separação de calcita e scheelita. A recuperação foi de 95% para CaWO_4 e 30% para CaCO_3 , ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais (KOSARIC et al., 1997). O biodispersan, polissacarídeo aniônico, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* A2, foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água (RON; ROSENBERG, 2002). Biossurfactantes de *Candida bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão (POLMAN et al., 1994).

3.8.7 Aplicações Terapêuticas

A surfactina possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (ARIMA et al., 1968; PEYPOUX et al., 1999). O biossurfactante produzido por *Rhodococcus*

erythropolis inibiu o vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (UCHIDA et al., 1989).

A iturina, lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (THIMON et al., 1995). A inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfactante produzido por *Lactobacillus* foi relatada. Valraeds-Martine et al., (1996) sugeriram o desenvolvimento de agentes antiadesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes.

3.8.8 Produtos de Higiene e Cosméticos

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos (BROWN, 1991).

Um produto comercial que continha 1 mol de soforolipídios e 12 moles de propilenoglicol, apresentou excelente compatibilidade dérmica, sendo utilizado como hidratante em cremes faciais (YAMANE, 1997). Alguns soforolipídios são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. Ltda desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídios, que posteriormente sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (DESAI; BANAT, 1997).

A preparação de biossurfactantes pela ação enzimática (principalmente lipases) sobre moléculas hidrofóbicas promoveu um novo direcionamento na produção destes compostos, principalmente para utilização em produtos de higiene e cosméticos (BANAT et al., 2000).

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES DE BRITO, C. F.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS, F. R.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C.; AZEVEDO, V. e TEIXEIRA, S. M. R. *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. **Genetics and Molecular Research** v. 3, p. 148–161, 2004.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZNSKI- PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 98, p. 843, 2003.

ANG, Y. M. A very rare and rapidly fatal case of *Chromobacterium violaceum* septicemia **Medical Journal of Malaysia** v. 59, n. 4, p. 535-537, 2004.

ANTONIO R. V.; CRECZNSKI-PASA T. B. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research** v. 3, p. 85-91, 2004.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 31, p. 488, 1968.

BALOWS, A; HAUSLER Jr, W. J.; HERRMANN, K. L.; ISEMBERG, H.D.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**, 5th ed. American Society for Microbiology, 1991.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing bacillus sp. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 15, n. 6, p. 591-594, 1993.

BANAT, I. M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANANERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 80-84, 1991.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.53, p. 495–508, 2000.

BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhance Oil recovery and oil pollution remediation: a review, **Bioresource Technology** v. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M. **Acta Biotechnol.**v. 15, p. 251, 1995a.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek** v. 85, p. 1-8, 2004.

BERGONZINI, C. Sopra un nuovo bacterio colorato. **Annuar Soc. Nat. Modena**, Series 2, v. 14, p. 149-158, 1881.

BERNHEIMER, A. W.; AVIGAD, L. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 61, n. 3, p. 361-369, 1970.

BIODIESELBR [http:// www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel](http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel), acessada dezembro de 2009.

BLOSSER, R. S.; GRAY, K. M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acetyl homoserine lactone autoinducers. **J. Microbiol. Methods**, v.40, p. 47-55, 2000.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comp. Rend. Acad. Sci.** v.94, p. 562-562, 1882.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W., eds., In: Garrity, GM, ed. – in – chief. **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Springer, 2. ed., v.1, p.721, 2001.

BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability, **PNAS**, v.100, n.20, p.11660-11665, 2003.

BROMBERG, N.; DURÁN, N. J. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. **Mol. Catal. B. Enzymatic**. v.11, p. 463-467, 2001.

BUCHANAN, E. Studies in the nomenclature and classification of bacteria. **J. Bacteriol**. v.3, p.52-57, 1918.

CALDAS, L. R. Photochemistry and photobiology in a virgin land, **Photochem. Photobiol**. v.26, p.1-2, 1977.

CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M.; TYRRELL, R. M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein, **Intern. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol**. Acad. Brasil. Cienc. Rio de Janeiro, p.121-132, 1978.

CALDAS, L. R. Um pigmento nas águas negras. **Ciência Hoje** v.11, p. 56-57, 1990.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, (Heidelberg) v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

CAMPBELL, S. C., OLSON, G. J., CLARK, T. R. and MC FETERS, G. Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. **J Ind Microbiol Biotechnol** v. 26, p. 134–139, 2001.

CAREPO, M. S. P., AZEVEDO, J. S. N., PORTO, J. I. R., BENTES-SOUZA, A. R., BATISTA, J. S., SILVA, A. L. C., SCHNEIDER, M. P. C. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. **Genet Mol Res** v. 3, p. 181-194, 2002.

CARRILLO, C.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F. J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochemica et Biophysica Acta**, Ámsterdam, v. 1611, n. 1-2, p. 91-97, Apr. 2003.

CASTRO, C. J. T. L. Avaliação da produção de ramnolipídios por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos** – Universidade Federal de Pernambuco, 2005.

CHANG-HUA, C.; LI-CHEN, L.; CHUN-ENG, L.; TZUU-GUANG, Y. *Chromobacterium violaceum* bacteremia: a case report. **J Microbiol Immunol Infect** v. 36, p. 141-144, 2003.

CHATTOPADHYAY, A.; KUMAR, V.; BHAT, N.; RAO, P. L. N. G. *Chromobacterium violaceum* Infection: A Rare But Frequently Fatal Disease. **J. Pediatric Surgery**, v. 37, n. 1, p.108-110, 2002.

CHERNIN, L. S.; WINSON, M. K.; THOMPSON, J. M.; HARAN S., BYCROFT B. W., CHET, I.; WILLIAMS, P., STEWART, G. S. A. B. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **J Bacteriol** v. 180, p. 4435-4441, 1998.

CHONG, C. Y.; LAM, M. S. Case report and review of *Chromobacterium* sepsis- a gram-negative sepsis mimicking melioidosis. **Singapore Med. J.** v.38, p.263-265, 1997.

CHOON-YUK, CHIANG; YUAN-TI, LEE; KEN-SEN, LIU; YA-LI, WANG; SHIH-MING, TSAO. *Chromobacterium violaceum* infection in Taiwan: a case report and literature review. **J Microbiol Immunol Infect** v. 40p. 272-275, 2007.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *torulopsis bombiloca*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANTÔNIO, R. V. Energetic metabolism of *Chomobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research** v. 3 n.1, p.162-166, 2004.

CROSSE, P. A.; SOARES, K.; WHEELER, J. L.; COOKE, K. L.; ADIN, C. A.; O'KELLEY, J., J.; LEVY, J. K. *Chromobacterium violaceum* Infection in Two Dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**. v. 42, p. 154-159, 2006.

DARRICARRERE, R.; URRESTARAZU, M.; CARVAJAL, Z.; UZCATEGUI, Z.; TAIBO, M.; PADRON, A., et al. Infecciones causadas por agentes oportunistas: *Corynebacterium JK* y *Chromobacterium violaceum*. **Arch Hosp Vargas** v. 28, p. 151-154, 1986.

DAVIES, E. S. *Chromobacterium*. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, editors, **Infectious Diseases and Medical Microbiology**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; p. 358-61, 1986.

DE AZEVEDO, M. B. M.; ALDERETE, J.; RODRIGUEZ, J. A.; DURÁN, N.; DE SOUZA, A. O.; FALJONI-ALARIO, A. Biological activities of violacein, a new antitumoral índole derivative, in inclusion complex with beta-cyclodextrin. **J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.**, v.37, p. 93-101, 2000.

DE MOSS, R. D. Violacein. **Antibiotics** v. 2, p. 77-81, 1967.

DESAI, A. J.; BANAT, I. M , Emulsifier production by *pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Current Science** v.57, p: 500-501,1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants, P. 65-97. In Kosaric, N.(ed.), **Biosurfactants: production, properties, applications**; KOSARIC, N., ed. Marcel Dekker, Inc., cap. 3, New York, N.Y., 1993.

DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; FAURE, D. Violacein: a molecule of biological interest originating from the soil-borne bacterium *Chromobacterium violaceum*. **Rev. Med. Intern.** v. 25, p. 659-662, 2004.

DIAS, J. P.; SILVANY, C.; SARAIVA, M. M.; RUF, H. R., GUZMAN, J. D.; CARMO, E. H. Cromobacteriose em Ilhéus, Bahia: investigação epidemiológica clínica e laboratorial. **Ver Soc Br Med Trop** v. 38, p. 503-6, 2005.

DIAS Jr., L. C.; MOTTA NETO, J. D.; RETTORI, D.; DURÁN, N. Semiempirical INDOS/S study on the absorption spectrum of violacein. **Journal of Molecular Structure**, v. 580, p. 85-90, 2002.

DROMIGNY, J. A.; FALL, A. L.; DIOUF, S.; PERRIER- GROS - CLAUDE J. D. *Chromobacterium violaceum*: a case of diarrhea in Senegal. **Pediatr Infect Dis J** v. 21, p. 573-574, 2002.

DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M.; GOUVEIA, E. R. Produção de Ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de Petróleo. XIV Simpósio Nacional de Fermentações. **SINAFERM 2003**. 5 a 8 de agosto 2003. Florianópolis. SC, 2003.

DURÁN, N.; FALJONI-ALARIO, A. Bacterial Chemistry- I. Studies of a potencial phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*, **An. Acad. Brasil. Cien.** v. 52, p. 297-302, 1980.

DURAN, N.; CAMPOS, V.; RIVEROS, R.; JOYAS, A.; HAUN, M. **Ann. Acad. Bras. Cienc.** v. 61, 1989.

DURÁN, N. A descoberta de um antibiótico. **Ciência Hoje**, v.11, p. 58-60, 1990.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. **Crit. Rev. Microbiol.** v.27, p. 201-222, 2001.

DURÁN, N.; RETTORI, D.; MENCK, C. F. M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 38-43, mai./jun., 2001.

DURAN, N.; JUSTO, G. Z.; MELO, P. S.; DE AZEVEDO, M. B.; BRITO, A. R.; ALMEIDA, A. B. et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with cyclodextrin. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 81, p. 387-396, 2003.

FARAMARZI, M. A.; STAGARS, M.; PENSINI, E.; KREBS, W.; BRANDL, H. Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. **J Biotechnol** v. 113, p. 321-326, 2004.

FOMBUENA, M.; BALLESTER, J. E.; PEDRO, F.; CHANZA, M.; GARCIA DEL TORO, M.; HERRERA BALLESTER, A. Infection by *Chromobacterium violaceum* in a patient with acquired immunodeficiency virus infection. **Enferm Infecc Microbiol Clin** v. 16, n. 1, p. 46-47, 1998.

FORSYTH, W. G. C.; HAYWARD, A. C.; ROBERTS, J. B. Occurrence of poly-b-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. **Nature** v. 182, p. 800-801, 1958.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. pp. 119–166. New York: Springer, 2001.

GEORGIU, G.; LIN S.; SHARMA, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technology**. V. 10, p. 60-65, 1992.

GRIER, D. D.; QUI, J.; RAND, K.; DONNELLY, W. A 13-year-old boy with a 2-day history of fever, vomiting and mental status changes. **Arch Pathol Lab Med** v. 128, p. 131-132, 2004.

HASSAN, H.; SUNTHARALINGAM, S.; DHILLON, K. S. Fatal *Chromobacterium violaceum* septicaemia. **Singapore Med J** v. 34, n. 5, p. 456-458, 1993.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R. (Eds), **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**, Williams e Wilkins, Baltimore, v. 1, p. 580-582, 1984.

HUNGRIA, M.; NICOLAS, M. F; GUIMARÃES, C. T.; VASCONCELOS, A. T. R. Tolerance to stresses and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genet Mol Res** v. 3, p. 102-116, 2004.

HUNGRIA, M.; ASTOLFI-FILHO, S.; CHUEIRE, L. M. O.; NICOLAS, M. F.; SANTOS, E. B. P.; BULBOL, M. R.; SOUZA-FILHO, A.; NOGUEIRA ASSUNÇÃO O. E.; GERMANO, M. G.; VASCONCELOS, A. T. R. Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon. **Lett Appl Microbiol** v. 41, p. 17–23, 2005.

ILORI, M. O.; AMOBI, A. C.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.

IPIECA **Dispersants and their role in Oil Spill Response**. IPIECA Report Series. London, UK, v. 5, p. 24, 1993.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALLK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

JACK, T. R. Microbially enhanced oil recovery. **Biorecovery**, v. 1, p. 59-73, 1988.

JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M.; CLARK, J. B.; FEERO, J. M.; REVUS, D. E.; MENZIE, D. E.; **Dev. Ind. Microbiol.** v. 24, p. 485, 1983.

KACHHOLZ, T.; SHINGMANN, M. Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment. In: KOSARIC, N.; CAIRS, W. L.; GRAY, N. C. C (Ed). **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Cap. 7, p. 183-210, 1987.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Curr. Sci.** v. 77, p. 116-126, 1999.

KAUFMAN, S. C.; CERAGO, D.; SCHUGURENSKY, A. First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. **J Clin Microbiol** v. 23 p. 956-958, 1986.

KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Microbially enhanced oil recovery (MEOR) . Part 1. Importance and mechanism of MEOR **Enzyme Microb. Technol.** v. 16, p. 160, 1994.

KIM, H. S.; YOON, B.; LEE C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido – 5. edição MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J. P.; LAMERS, G. E. M.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipolpeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004

LEE, J., KIM, J. S., NAHM, C. H., CHOI, J. W.; KIM, J.; PAI, S. H.; MOON, K. H.; LEE, K.; CHONG, Y. Two cases of *Chromobacterium* infection after injury in a subtropical region. **J Clin Microbiol** v. 37, p. 2068-2070, 1999.

LEON, L. L.; MIRANDA, C. C.; SOUZA, A. O.; DURÁN, N. J. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Antimicrob. Chemother.** v.48, p. 449-450, 2001.

LIMA, J.B. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. Minas Gerais, 2007. Tese doutorado, 190p

LIN, S. C. Biosurfactants; recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 66, p. 109-120, 1996.

LIN, S, C., SHARMA, M. M., GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Program**, v 9, p. 138-145, 1993.

MACHIN, C., LEY, M., TORRES, L. Infección por *Chromobacterium violaceum*: presentación de un caso con evolución fatal. **Rev Cub Med Trop** v.38, p. 353-357, 1986.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology – v. 52**. USA: Academic Press, cap. 4, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of bacillus subtilis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Inglaterra, v. 20, n. 1, p. 48-52, Jan. 1998.

MAKKAR, R. S; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactante Production and their new applications. **Appl Bicrobiol Biotechnol**. v. 58, p. 428-34, 2002.

MARSHALL, B.; CABALLERO, E.; MEDINA, E.; MENDOZA, N.; PINILLA, L.; TALAVERA, D. et al. Septicemia fatal causada por *Chromobacterium violaceum*: informe de un caso. Complejo Hospitalario Metropolitano, 1986. **Rev Med Caja Seguro Soc** v. 20, p. 98-100, 1988.

MARTINEZ, R.; VELLUDO, M. A. S. L.; SANTOS, V. R.; DINAMARCO, P. V. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case Report. Revista **do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.2, p. 111-113, 2000.

MELO, P. S.; JUSTO, G. Z.; DE AZEVEDO, M. B., DURAN, N.; HAUN, M. Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. **Toxicology** v. 186, p. 217–225, 2003.

MENEGASSI, B. Extrusão de farinha de mandioquinha-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 252-258, out./dez. 2007

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of industrial by-products for biosurfactant production. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 71, n. 1, p. 61-64, 1994.

MIDANI, S.; RATHORE, M. *Chromobacterium violaceum* infection. **South Med J** v. 91, p. 464- 466, 1998.

MOORE, C.; LANE, J.; STEPHENS, J. Successful treatment of an infant with *Chromobacterium violaceum* sepsis. **Clin Infect Dis** v. 32, n. 6, p. 107-110, 2001.

MOSES, V. Microbes and oil recovery. **Microbiol. Sci.** v. 4, p. 305, 1987.

MUKHERJEE, S.; PALASHPRYA, D. A.; RAMKRISHNA, S. E. N. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**. v. 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and environmental Microbiology**, v. 55, p. 3016-3019, 1989.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. n. 60, p. 371-380, 2001.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 362-366, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. "Biossurfactantes: propriedades e aplicações". **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PETRILLO, V. F.; SEVERO, V.; SANTOS, M. M.; EDELWEISS, E. L. Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South América. **J. Infect** v. 9, p. 167-169, 1984.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 51, p. 553, 1999.

PINEDA, M.; VARGAS, J.; LUENGO, H. *Chromobacterium violaceum*. The first reports in Venezuela and literatura review. 9th International **Congress on Infectious Diseases**. Buenos Aires 10 al 13 de abril de 2000.

PIROLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2006.

POLMAN, J.K.; BRECKENRIDGE, C. R.; STONER, D. L.; ANDREWS, G. Biologically derived value added products from coal. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New Jersey, v. 54, n.1-3, p. 249-255, 1995.

PONTE, R.; JENKINS, S. - Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant waters. **Pediat. infect. Dis. J** v. 11, p. 583-586, 1992.

PORTER, M. R. **Handbook of surfactants**. New York: Chapman & Hall, 2. ed., 1994.

RAY, P.; SHARMA, J.; MARAK, R. S.; SINGHI, S.; TANEJA, N.; GARG, R. K.; SHARMA, M. *Chromobacterium violaceum* septicemia from north India. **Indian J Med Res** v. 120, p. 523-526, 2004.

RETTORI, D. Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*. (Duran, N. Orientador), **Tese de Mestrado**, Instituto de Química, UNICAMP, 2000.

RIOS, C.; DELGADO, S.; SISTEMAS, O. Septicemia por *Chromobacterium violaceum*. **Rev Hosp Niño** (Panamá) v. 5, p. 22-25, 1985.

ROCHA, J. M. S. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia Boletim de Biotecnologia, vol. 3, p. 5-11. 1999.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n.3, p. 249-252, 2002.

ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D. L. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 37, p. 402, 1979.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 52, p. 154, 1999.

SAMPAIO-SA, M.; AMORIN, L. R.; CASELA, M.; BRITES, C. Frequent isolation of *Chromobacterium violaceum* in patients with life threatening diseases, in Bahia, Brazil. Program and abstracts of 45th **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington DC., 2005.

SHAO, P. L.; HSUEH, P. R.; CHANG, Y. C.; LU, C. Y.; LEE, C. Y.; HUANG, L. M. *Chromobacterium violaceum* infection in children: a case of fatal septicemia with nasopharyngeal abscess and literature review. **Pediat. infect. Dis. J.**, v. 21, p. 707-709, 2002.

SHEPHORD, R. et al. Novel bioemulsifier from microorganism for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n.3, p: 316-320, 1995.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.

SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HATA, T., HAYASAKA, S., KOJIMA, A., KATO, H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. **Japan Agric. Res. Quart.**, v. 34, p.131-140, 2000.

- SILVENDRA, R.; TAN, S. H. Pathogenicity of nonpigmented cultures of *Chromobacterium violaceum*. **J Clin Microbiol** v. 5, p. 514-516, 1977.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Application Aspects. *Biotechnol.*, v. 25, p. 99-121, 2007.
- SIQUEIRA, I. C.; DIAS, J.; RUF, H. et al. - *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. **Emerg. infect. Dis.**, v. 11, p. 1443-1445, 2005.
- SIRINAVIN, S.; TECHASAEENSIRI, C.; BENJAPONPITAK, S.; PORNKUL, R.; VORACHIT, M. Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: Case report and review. **Pediatr Infect Dis J** v. 24, p. 559-61, 2005.
- SMITH, A. D.; HUNT, R. J. Solubilization of gold by *Chromobacterium violaceum*. **J Chem Technol Biotechnol**, Part B, *Biotechnology* 35, 110–116, 1985.
- SNEATH, P.H.A.; WHEALAN, J.P.F.; SINGH R.B.; EDWARD, D. Fetal infection by *Chromobacterium violaceum*. **Lancet II**, p. 276-277, 1956.
- STANGUELLINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 8, n.1, p. 4-12, 1997.
- STEINBUCHER, A.; DEDZI, E. M.; MARCHESSAULT, R. H.; TIMM, A. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 39, 443–449, 1993.
- STEINBERG, J. P.; RIO, C. D. Other gram-negative and gram-variable bacilli. In: MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R, eds. **Principles and practice of infectious diseases**. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2755, 2005.

TEE, H. P.; FRANCIS, A. L.; HOW, S. H. *Chromobacterium violaceum* infection. **Br J Hosp Med (Lond)** v. 67, n. 4, p. 208-209, 2006.

TEOH, A. Y.; HUI, M.; NGO, K. Y.; WONG, J.; LEE, K. F.; LAI, P. B. Fatal septicaemia from *Chromobacterium violaceum*: case reports and review of the literature. **Hong Kong Med J** v. 12, p. 228-231, 2006.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, M.G.; **FEMS Microbiol. Lett.** v. 128, p. 101, 1995.

TI, T. Y.; TAN, W. C.; CHONG, A. P.; LEE, E. H. Nonfatal and fatal infections caused by *Chromobacterium violaceum*. **Clin Infect Dis** v. 17, n. 3, p. 505-507, 1993.

TOBIE, W. C. The pigment of *Bacillus violaceus*. The apparent relation of violacein to indigo. **Soc. Am. Bacteriol.** 39th General meeting, p.11-12, 1934.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 3. edição São Paulo:Editora Atheneu, 1999

TORABIZADEH, H.; SHAJAOSADATI, S. A.; TEHRANI, H. A. Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 29, n. 8, p. 734-737, 1996.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T.; **Agric. Biol. Chem.** v. 53, p. 757, 1989.

URGUN-DERMITAS, M. et al. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n.3, p. 145-164, 2006.

VALRAEDS-MARTINE, M. C.; VANDERMEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. **J. Colloids Surf.**, v. 8, p. 51, 1996.

VAN DYKE, M. I.; H. LEE; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, n. 9, p. 241-252, 1991.

VASCONCELOS, A. T. R., ALMEIDA, D. F., ALMEIDA, F. C., ALMEIDA, L. G. P., ALMEIDA, R., ALVES-GOMES, J. A., ANDRADE, E. M., ANTÔNIO, R. V., ARARIPE, J., ARAÚJO, M. F. F., ASTOLFI-FILHO, S., AZEVEDO, V., BAPTISTA, A. J., BATAUS, L. A. M., BATISTA, J. S., BELÓ, A., VAN DEN BERG, C., BLAMEY, J., BOGO, M., BONATTO, S., BORDIGNON, J., BRITO, C. A., BROCCHI, M., BURITY, H. A., CAMARGO, A. A., CARDOSO, D. D. P., CARNEIRO, N. P., CARRARO, D. M., CARVALHO, C. M. B., CASCARDO, J. C. M., CAVADA, B. S., CHUEIRE, L. M. O., CRECZYNSKI-PASA, T. B., DURAN, N., FAGUNDES, N., FALCÃO, C. L., FANTINATTI, F., FARIAS, I. P., FELIPE, M. S. S., FERRARI, L. P., FERRO, J. A., FERRO, M. I. T., FRANCO, G. R., FREITAS, N. S. A., FURLAN, L. R., GAZZINELLI, R. T., GOMES, E. A., GONÇALVES, P. R., GRANGEIRO, T. B., GRATTAPAGLIA, D., GRISARD, E. C., GUIMARÃES, C. T., HANNA, E. S., HUNGRIA, M., JARDIM, S. N., LAURINO, J., LEOI, L. C. T., LIMA, L. F. A., LOUREIRO, M. F., LYRA, M. C. C. P., MACEDO, M., MADEIRA, H. M. F., MANFIO, G. P., MARANHÃO, A. Q., MARTINS, W. S., DI MAURO, S. M. Z., MEDEIROS, S. R. B., MEISSNER, R. V., MOREIRA, M. A. M., NASCIMENTO, F. F., NICOLAS, M. F., OLIVEIRA, J. G., OLIVEIRA, S. C., PAIXÃO, R. F. C., PARENTE, J. A., PEDROSA, F. O., PENA, S. D. J., PEREIRA, J. O., PEREIRA, M., PINTO, L. S. R. C., PINTO, L. S., PORTO, J. I. R., POTRICH, D. P., RAMALHO-NETO, C. E., REIS, A. M. M., RIGO, L. U., RONDINELLI, E., SANTOS, E. B. P., SANTOS, F. R., SCHNEIDER, M. P. C., SEUANEZ, H. N., SILVA, A. M. R., SILVA, A. L. C., SILVA, D. W., SILVA, R., SIMÕES, I. D. C., SIMON, D., SOARES, C. M. A., SOARES, R. B. A., SOUZA, E. M., SOUZA, K. R. L., SOUZA, R. C., STEFFENS, M. B. R., STEINDEL, M., TEIXEIRA, S. R., URMENYI, T., VETTORE, A., WASSEM, R., ZAHA, A. AND SIMPSON, A. J. G. Complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and

exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**v.100, p.11660-11665, 2003.

VELIKONJA, N.; KOSARIC, N. Biosurfactants: production, properties, applications. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. (Ed). **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Decker, cap. 16, p. 650-678, 1993.

VIDALLI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

WATERS, J. Em Recent Developments in the Analysis of Surfactants; PORTER, M. R., ed.; Crown House: UK, cap. 6, 1991.

WATINE, J. ; COURTADE, A. ; PHAM, E.; LIEVROUW, C.; DOBOURDIEU, B.; GUERIN, B., et al. *Chromobacterium violaceum* peritonitis: Case report and literature review. **Ann Biol Clin (Paris)** v. 64, p. 327-30, 2006.

WINSOR, P.A. Hidrotody, solubilization, and related emulsification processes. **J. Chem. Trans. Faraday Soc.**, London, v.44, n.1, p.376-398, 1948.

WOOLEY, P. G. *Bacillus violaceus manilae* (a pathogenic organism). **Bull John Hopkins Hospital** v.16, p. 89-93, 1905.

YAMANE, T. Enzyme technology for the lipids industry: an engineering overview **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 64, p. 1657-1662, 1987.

YU, V. L.; MERIGAN J. R.; T. C., BARRIERE, S. L. **Antimicrobial therapy and vaccines**. Williams e Wilkins, 1999.

ZIMMERMAN, B. Review of Bergonzini on *Chromobacterium*, **Bo. Centralbl.** v.4, p. 1528-1530, 1881.

Factorial design applied to biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum*

* Manuscrito publicado no Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, v 1, p. 249-253, 2009.

Factorial design applied to biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum*

Adriana Almeida Antunes^{1,3}; A. M. A. T. Jara^{2,3}; J. M. Luna^{1,3}; C. D. C. Albuquerque³; A. S. Messias³; C. A. Alves-Silva³; G. M. Campos-Takaki³

¹Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Brazil;

²Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais/UNICAP, Brazil;

³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

*Autor Correspondente: Galba Maria de Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 50050-900 Recife-Pernambuco, Brasil.

**FACTORIAL DESIGN APPLIED TO BIOSURFACTANT PRODUCTION
BY *Chromobacterium violaceum***

Adriana Almeida Antunes^{1,3}; A. M. A. T. Jara^{2,3}; J. M. Luna^{1,3}; A. S. Messias³; C. A. Alves-Silva³; G.M. Campos-Takaki³.

¹Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil; ²Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais/UNICAP, Brazil; ³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, * takaki@unicap.br galba_takaki@yahoo.com.br

The aim of the present work was to analyze the production of biosurfactants agents from two strains of *Chromobacterium violaceum*, UCP 1467, isolated from Amazons water, and the strain UCP 1489, was isolated from Pernambuco soil, respectively. The condition it was observed with UCP 1467 the reduction of the superficial tension of the water of 72mN/m to 33,24mN/m. whereas the strain UCP 1489 showed lower tension f 31m/Nm. The index of emulsification of the metabolic liquid of free cells was determined for different substratum, 60% of emulsification with canola oil for strain UCP 1467 (condition 6) and in conditions 2, 3, 6 and 11 for strain UCP 1489 getting 31% of emulsification, both with agitation. The activities of emulsification had shown resulted between 4.8 and 6.0 U.A.E. for UCP 1467 whereas UCP 1489 showed to activities of 6 U.A.E. for all tested substratum. The results indicated that strain UCP 1467 for index emulsification and the strain UCP 1489 as good producer of biosurfactant with low superficial tension and high emulsification activity.

Key words: *Chromobacterium violaceum*, biosurfactant, emulsification activity, superficial tension

1. Introduction

Biosurfactants are a wide class of amphipathic molecules that is capable to reduce surface and interfacial tension between gases, liquids and solids with a large industrial variety and environmental applications, as due lower toxicity, biodegradability and effectiveness in a narrow pH and temperature range. However, these limitations, the interest on biosurfactants (surfactants of microbial origin), produced by certain bacteria, yeast and fungi, has increased due to their low toxicity, biodegradable nature, effectiveness at extreme temperature, pH, salinity and their role in saving natural ecosystem by enhancing the biodegradation during hydrocarbon spills [1,2]. The bacteria are the largest responsible for the production of these compounds. These microorganisms have been isolated of the soil, sea water, sediments, and polluted areas. The biosurfactants have several advantages over chemical surfactants including lower toxicity and higher biodegradability, and effectiveness at extreme temperatures or pH values [3,4]. In spite of the advantages, fermentation must be cost competitive with chemical synthesis, and many of the potential applications that have been considered for biosurfactants depend on whether they can be produced economically. Fermentation medium can be representing almost 30% of the cost for a microbial fermentation [5,6,7]. Complex media commonly was employed for growth and lactic acid by bacteria is not economically attractive due to their high amount of expensive nutrients such as yeast extract, peptone and salts [8,9,10].

2. Material and Methods

2.1 Microorganism

The microorganism used was *Chromobacterium violaceum*, UCP 1489 (isolated of small river by Silva (2006) [9] from contaminated area of Pernambuco State, Brazil), and strain UCP 1467, isolated in Amazon, from samples of water and soil respectively and deposited in the Cultures Collection of the Catholic University of Pernambuco, Brazil. Both strains were maintained in Nutrient Agar

(Difco) containing (w/v): beef extract (3g/L), Peptone (5g/L), and agar (15g/L) at 5°C.

2.2 Collect and isolation

A water sample was collected in Paca River located in the city of Camaragibe, Pernambuco. The water was collected and kept in bottle amber and submitted to the isolation and identification of microorganisms. Technique of the multiple pipes was used, being carried through the presumptive assay, using 10 mL of the sample and inoculated in Petri dishes containing nutritive agar, and incubated at 30°C, for 24 hours for counting of the colonies. The microorganisms isolated from contaminated water produced violet colonies, characterized as *Chromobacterium violaceum*. The strain was deposited as UCP 1489 and the first one of the work. The second one, UCP 1467, was isolated in soil sample of the Amazon region [9].

2.3 Media, Cultivations conditions and Biosurfactant production

The strains of *Chromobacterium violaceum*, UCP 1489 and UCP 1467, were transferred from Nutrient agar to Luria Bertani (LB) [10] solid medium Petri dishes [tryptone - (10g/L); yeast extract - (5g/L); NaCl - (5g/L); glucose - (5g/L)] at 30°C for 24-48 hours, then, a loopful of culture was transferred to Erlenmeyer flasks of 500mL capacity containing 100mL of Luria Bertani liquid medium [only tryptone - (10g/L) and yeast extract - (5g/L) as base] added with different concentrations of glycerol (2.5%, 5.0% and 7,5%), sodium chloride (0.5%, 2.75% e 5.0%) and industrial corn (2.5%, 5.0% and 7.5%) in shaker at 150 rpm and stationary condition for 72 hours at 30°C for the biosurfactant production. The pH was adjusted to 7.0 and the Luria Bertani culture contained an initial optical density of 0.5. After 72 hours of growth it was analyzed the superficial tension, the activity and index of emulsification of the strains in both conditions: in shaker and stationary.

2.4 Emulsification activity

Emulsification activity was measured using the method described by Cooper and Goldenberg [11]. We used 6 mL of n-hexadecane, and the oils canola, soy, and babasu oil were added to 4 mL of the culture broth free of cells in a graduated screw cap test tube and vortexed at 3000 rpm for 2 minutes. The emulsion stability was determined after 24 hours, and the emulsification index was calculated by dividing the measured height of the emulsion layer by the mixture's total height and multiplying by 100.

2.5 Surface activities

Surface tension and critical micellar concentration (CMC) were determined on cell free broth obtained by centrifugation the cultures at 10000 X g for 15 minutes with an automatic Tensiometer (Sigma 70-KSVLTD/Finland) according Kuyukina [12], using the Du Nouy ring method at room temperature. The CMC was determined by measuring the surface tensions of dilutions of cell free broth in distilled water up to a constant value of surface tension.

2.6 Factorial planning

The complete factorial planning of 2^3 with 4 repetitions of a central point was accomplished to analyze the main effects, biomass production and the biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum*

Table 1 - Factorial design of 2^3 and 4 repetitions of a central point applied to biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum*

Conditions	LB +	LB +	LB +
	Glycerol	NaCl	CORN STEEP
	mL/L)	(g/L)	(g/L)
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.	0	0	0
10.	0	0	0
11.	0	0	0
12.	0	0	0

Level +1: glycerol 7.5(ml/L), sodium chloride 5.0 (g/L), corn steep 7.5 (g/L);

Level -1: Glycerol 2.5(ml/L), sodium chloride 0.5(g/L), corn steep 2.5(g/L),;

Level 0(%): glycerol 5.0(ml/L), sodium chloride (g/L),2.75 , corn steep 5.0(g/L),.

3. Results and Discussion

The superficial tensions of the *C. violaceum* UCP 1489 reduced of the superficial tension of the water from 72 mN/m to 33 mN/m (condition 5), whereas the strain UCP 1467 showed the lower tension of 31 mN/m (condition 8), both in stationary condition (Table 2). In agreement with results obtained with the same strain, UCP 1489, by Antunes et al., [13] in Luria Bertani broth medium added of different types of oils (soy, canola, corn or babasu) showed significant reductions of the superficial tension, once the tensions founded were

around 27 mN/m in shaker. The index of emulsification of the metabolic liquid of free cells was determined for different substratum, 60% of emulsification with canola oil for strain UCP 1467 (condition 6) and in conditions 2, 3, 6 and 11 for strain UCP 1489 getting 31% of emulsification, both with agitation. The activities of emulsification had shown resulted between 4.8 and 6.0 U.A.E. for UCP 1467 whereas UCP 1489 showed activities of 6 U.A.E for all tested substratum. The best results showed UCP 1467 strain the higher emulsifier index, and UCP 1489 as good producer of biosurfactant with lower superficial tension and higher emulsifier activity.

Table 2 - Strains of *Chromobacterium violaceum*, UCP 1467 and UCP 1489 with the superficial tensions of each condition after 72 hours of cultivation in shaker and stationary condition.

Number of condition	UCP 1467	UCP 1467	UCP 1489	UCP 1489
	(shaker at 150 rpm)	(stationary condition)	(shaker at 150 rpm)	(stationary condition)
1.	38.57	40.63	38.37	34.33
2.	34.15	36.62	39.68	35.43
3.	40.95	36.27	41.15	40.30
4.	37.90	40.39	40.51	36.58
5.	33.67	38.00	50.10	33.24
6.	34.13	35.86	37.09	33.69
7.	39.83	36.60	41.17	39.63
8.	38.57	31.20	39.41	36.87
9.	34.44	36.02	40.20	37.20
10.	35.49	36.50	42.60	37.71
11.	35.00	37.68	40.34	36.76
12.	35.76	37.04	35.29	37.37

The table 3 showed comparative production of biosurfactant production during 24, 48 and 72h of fermentation using different substrates. The best condition

was showed at 24h using soy oil (hydrophobic substrate) followed glucose (soluble substrate).

Table 3 - Biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum*, (UCP 1489), using different substrates and the superficial tensions of each condition for fermentation.

<i>C. violaceum</i> UCP 1489	24 HOURS	48 HOURS	72 HOURS
Soy oil	26.00	26.31	27.86
Corn oil	26.16	27.05	27.32
Canola oil	26.58	27.04	27.13
Glucose	26.07	27.15	27.61

In Pareto diagram of the effects standard is illustrated in Figure 1, to a level of 95% confidence, it can be observed that sodium chloride was the factor that, with statistical significance, more favored increasing the surface tension when its concentration became the level -1 for the level +1. The glycerol and corn oil, in that order, were the factors that with statistical significance, more increasing the surface tension, or more favored the reduction of the surface tension, when their concentrations passed to the level -1 for the level +1. The interaction between the glycerol and corn oil also showed statistical significance, and increase surface tension. The interaction of sodium chloride and the corn oil favored, not significantly, the increase surface tension, and the interaction of glycerol with sodium chloride do not favored, although not significantly, increased surface tension, or not significantly, the reduction of the surface tension.

In Pareto diagram, Figure 2 showed the effects to a level of 95% confidence, it can be observed that the factors, corn steep, glycerol and sodium chloride, in that order, do not favored, with statistical significance reduction of the surface tension, when their concentrations passed the level -1 for the level +1. The interaction between the glycerol and corn steep do not favored, with statistical

significance helped significantly to reduce the surface tension. The interaction of sodium chloride with corn steep do not favored, not significantly helped, but does not significantly, the reduction of the surface tension. And, the interaction of glycerol with sodium chloride favored, not significantly the reduction of the surface tension.

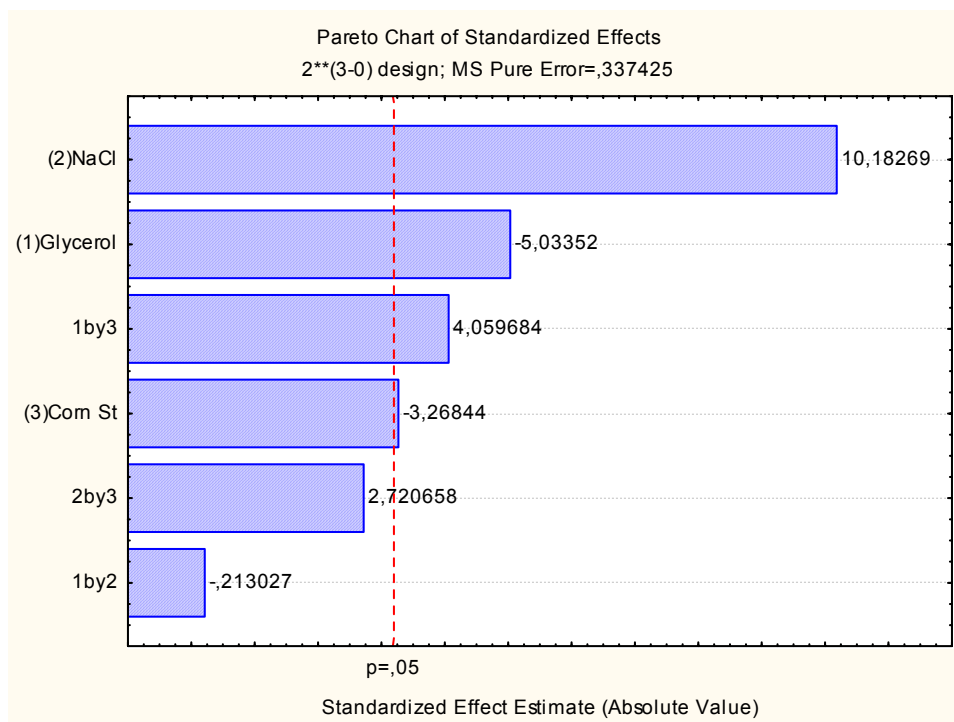


Figure 1 – Pareto Diagram of the effects standards. The independent variables: glycerol, sodium chloride, corn steep, and corn oil, and the dependent variables: superficial tension. Microorganism: UCP 1467, and condition of incubation: 150 rpm

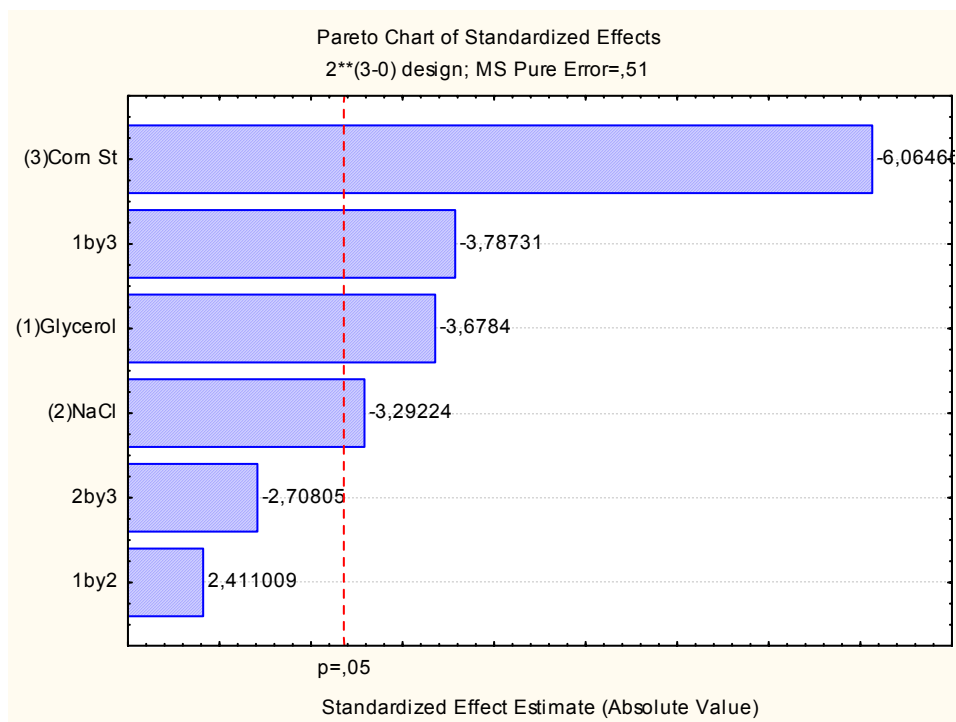


Figure 2 –Pareto Diagram of the effects standard. Independent Variables: glycerol, sodium chloride, corn steep. Dependent variable: surface tension. Microorganism: UCP 1467. Condition of incubation: static

4. Conclusions

The best results indicated that strain UCP 1489 as good biosurfactant producer with lower superficial tension and higher emulsifier activity index. In conclusion the results demonstrated the potential of the *C. violaceum* for the biosurfactant production, and indicating future perspectives for bioremediation process.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES, FACEPE, CNPq and FINEP

References

- [1] Oliveira, F. J. S; Vasquez, L.; França, F. P. Production of biosurfactants by *Pseudomonas alcaligenes* using palm oil. 2th Mercosur Congress on Chemical Engineering (ENPROMER), Costa Verde – RJ, Brazil, 2005
- [2] Pruthi, V. Cameotra, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techniques*, v.11, n.9, p.671 – 674, 1997
- [3] N. Kosaric, Biosurfactants in industry, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 1731-1737, 1998
- [4] S. Cameotra, R. Makkar. Synthesis of Biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 520-529, 1998
- [5] T. Miller, B. Churchill, Substrates for large-scale fermentations, in: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp.127-140, 1986
- [6] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hagerdal, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Technol.* 26, 87-107, 2000
- [7] V. K. Batist, R. Lal, H. Chander, Effect of nutritional factors on the production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biovar diacetylactis*, *Aust. J. Dairy Technol.* 74-76, 1990
- [8] P. Jensen, K. Hammer, Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4363-4366, 1993
- [9] Antunes, A.A.; *Chromobacterium violaceum*: Caracterização Cultural, Bioquímica, Molecular e Detecção da Produção de Polihidroxialcanoato – PHA. Universidade Federal de Pernambuco, 78 páginas. (Tese de Mestrado em Ciências Biológicas), 2006
- [10] Sambrook, R.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
- [11] Cooper, D.G. and Goldenberg, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental microbiology*, 53, 224-229, 1987

- [12] Kuyukina, M.S.; Ivshina, I.B.; Philp, J.C.; Christofi, N.; Dunbar, S.A.; Ritchkova, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. v. 46, p. 149-156, 2001.
- [13] Antunes, A. A.; Silva, M. L. R. B. Silva, C. A. Alves-Silva; Campos-Takaki, G. M. (2006) Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, n.1, p.48-55.

**Caracterização bioquímica de um novo isolado
de *Chromobacterium violaceum* e potencial
biotecnológico na produção de biossurfactante**

* Manuscrito a ser submetido para publicação no
World Journal Microbiology and Biotechnology

Caracterização Bioquímica de um novo isolado de *Chromobacterium violaceum* e potencial biotecnológico de produção de biossurfactante

Adriana Almeida Antunes^{1,2}; Marcelo Maranhão Antunes³; Josineide Ferreira Barros⁴;
Carlos Alberto Alves da Silva^{2,5}; Galba Maria Campos Takaki^{2,5*}

¹Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

²Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) - Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), CEP 50050-590 Recife – Pernambuco - Brasil.

³Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN – Recife - PE

⁴Hospital Agamenon Magalhães – Recife - PE

⁵Departamento de Química - Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), CEP 50050-590 Recife – Pernambuco - Brasil.

*Autor Correspondente: Galba Maria de Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, nº 42, Bloco J, térreo, Boa Vista, Recife, PE, Brasil, CEP: 50050-590

Resumo

Estudos foram realizados com uma nova linhagem de *Chromobacterium violaceum* para identificação e caracterização, assim como potencial biotecnológico de produção de biossurfactante em meio alternativo. A nova linhagem de *C. violaceum* apresentou resultado positivo para os testes bioquímicos arginina, ácido glutâmico, leucina, fenilalanina, triptófano, lisina, acetato, adonitol, citrato, colistina, D-manitol, alfacetoglutárico, malonato, polimixina B e gama-glutamil sendo negativo para prolina, L-prolina, fosfato, Beta-alose, dextrose, frutose, D-galactose, melibiose, sorbitol, sacarose, ac. galacturônico, L-arabinose, L-ramnose, maltose, ornitina, uréia e esculina. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentam resistência apenas para ampicilina, ampicilina-sulbactam e cefalotina, sendo sensível para amicacina, aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, polimixina B, sulfatrimetoprim e tigeciclina. *C. violaceum* apresentou produção de biossurfactante exibindo uma excelente atividade tensoativa reduzindo a tensão superficial da água de 71 para 26 mN/m no ensaio 11 do planejamento fatorial (triptona 0,5; milhocina 4,0 e óleo pós fritura 7,5%), apresentando atividade de emulsificação de 68 e 66% com petróleo e óleo motor respectivamente no período de 72 horas, sugerindo a utilização do biossurfactante como tensoativo e emulsificante.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*, caracterização bioquímica, tensoativo, emulsificante

INTRODUÇÃO

Chromobacterium violaceum é um microrganismo de vida livre, Gram-negativo, anaeróbio facultativo que vive em regiões tropicais, geralmente em solos alagados e rios. No Brasil é encontrado principalmente às margens do Rio Negro, na Amazônia (BRAZILIAN NATIONAL PROJECT CONSORTIUM). Esta bactéria se caracteriza principalmente pela produção de um pigmento violeta denominado violaceína, cuja substância apresenta diversas aplicações biológicas como antibiótica, antitumoral, antichagásica, antifúngica e antioxidante, além de produzir polihidroxialcanoato – PHAs (DURÁN et al, 2001).

Biossurfactantes são compostos com atividade tensoativa, produzidos por várias espécies de microrganismos, classificados de acordo com a sua composição química e origem microbiana (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; MULLIGAN, 2005) e suas principais classes incluem os glicolipídios, lipossacarídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídios (DESAI; DESAI, 1993; BOGNOLO, 1999; LANG, 2002; MAIER, 2003) e alguns polímeros (DESAI; DESAI, 1993; MAIER, 2003). A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura são de origem bacteriana, onde os mais conhecidos são produzidos pelos gêneros: *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* e *Arthrobacter sp.* (GOUVEIA et al., 2003).

Os biossurfactantes são produzidos naturalmente pelos microrganismos a partir de vários substratos, incluindo açúcares, óleos e resíduos orgânicos. Esses compostos estão relacionados a diferentes aspectos do funcionamento celular, a exemplo da promoção da motilidade, sinalização e diferenciação celular; emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água, aderência ou liberação da célula de superfícies, formação de biofilmes e atividade antibiótica (LIN, 1996; MORIKAWA et al., 2000; NITSCHKE et al., 2002; KEANS et al., 2003; SINGH et al., 2007; SEN, 2008).

Pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos regionais e glicose demonstraram a produção desses compostos pelo microrganismo (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 2001; VANCE-HARROP et al., 2003; RUFINO et al., 2005). Os

biossurfactantes têm sido testados em muitas aplicações ambientais, como na biorremediação, na dispersão de manchas oleosas e na recuperação de petróleo, substituindo os surfactantes químicos. Além disso, também, podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética, detergentes e agrícola (TULEVA et. al., 2002). Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes produzidos por bactérias não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica (SHEPERD et al., 1995).

Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilizante e dispersão de fases (BANAT, 2000). A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Neste trabalho foi realizada a caracterização bioquímica da nova linhagem de *Chromobacterium violaceum* UCP 1552 e avaliado o potencial de produção de biossurfactante, utilizando triptona, milhocina e óleo pós-fritura como meio alternativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

No presente estudo foi utilizada a linhagem de *Chromobacterium violaceum* UCP 1552 isolada de amostra de água procedente do bairro da Várzea, município de Recife, estado de Pernambuco pertencente ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, sendo mantida em meio Luria Bertani (LB) Ágar a 5°C.

Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada por metodologia automatizada, utilizando-se o Sistema BD Phoenix, destinado a identificação (ID) rápida de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas clinicamente significativas e ou aquelas que são oportunistas causadoras de infecção em seres humanos e em animais. O sistema BD Phoenix consiste em um lado ID, para identificação, com 51 cavidades e um lado TSA, para os testes de sensibilidade, com 85 cavidades. O lado ID contém 45 cavidades contendo substratos bioquímicos desidratados e 2 cavidades para controle de fluorescência. O lado TSA contém potencialmente até 84 cavidades com agentes antimicrobianos desidratados e uma cavidade para controle de crescimento. O sistema utiliza um indicador de redox colorimétrico otimizado para TSA e diversos indicadores colorimétricos e fluorométricos para ID. Os painéis estão disponíveis como ID somente, TSA somente ou uma combinação de ID/TSA (painel combo), o que permite realizar a identificação isoladamente, o teste de sensibilidade isoladamente ou os dois em conjunto. Muitos dos testes presentes nos painéis para identificação são baseados em modificações de métodos clássicos, tais como: testes de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos com a utilização de substratos cromogênicos e fluorogênicos, bem como substratos que são fontes únicas de carbono, para a identificação de microrganismos.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada por método convencional de Kirby Bauer, (1966), através da difusão em disco, sendo testados os seguintes antibióticos: amicacina, ampicilina, ampicilina-sulbactam, aztreonam, cefalotina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, polimixina B, sulfatrimetoprim e tigeciclina, uma vez, que esta espécie ainda não está incluída na padronização preconizada pelo *CLSI* (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2003).

Condições de cultivo

A linhagem de *C. violaceum* UCP 1552 foi incubada em caldo Luria Bertani (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, cloreto de sódio 5g/L, glicose 5g/L) e mantida sob agitação orbital de 150 rpm, a 30°C, para obtenção do pré-inóculo com uma DO_{600nm} de 0,5 nm. Foram utilizados doze frascos de Erlenmeyers com capacidade de 500mL contendo 100mL em diferentes concentrações de triptona, milhocina e óleo de soja pós-fritura (de acordo com planejamento) e 5mL do pré-inóculo, mantidos nas mesmas condições anteriores por 72 horas. Após o período de incubação, os frascos foram submetidos à centrifugação de 10.000 X g por 15 minutos, à temperatura de 15°C e posterior filtração em filtro de 0,22 μm .

Planejamento fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial completo de 2^3 , com 8 ensaios e 4 pontos centrais, para analisar os principais efeitos e interações das variáveis concentrações de triptona, milhocina e óleo de soja pós fritura sobre as variáveis respostas: tensão superficial e atividade de emulsificação. A matriz do planejamento codificada e os valores das variáveis independentes nos níveis -1, +1 e o ponto central encontram-se na tabela 1. A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa STATISTIC versão 8.0 da Statsoft, USA.

Tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada através do líquido metabólico livre de células medido após 72 de cultivo em tensiômetro automático (KSV-Sigma 70), utilizando o anel de DU NUOY (KUYUKINA et al., 2001).

Atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras retiradas do meio de cultivo ao longo da fermentação foram centrifugadas 10000 X g

durante 15 minutos e, em seguida, analisadas conforme Cooper e Goldenberg (1987). Foram adicionados em um tubo graduado 1,0 mL de diferentes substratos hidrofóbicos (óleo de soja in natura e pós fritura, óleo de canola, óleo motor e petróleo) e 2,0 mL do líquido metabólico livre de células e a mistura agitada em vórtex por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas (E_{24}) e o índice de emulsificação foi calculado dividindo-se a altura da emulsão pela altura total da mistura e multiplicando-se por 100 para fornecer o percentual da emulsão formada no tubo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica de microrganismos, assim como o perfil de sensibilidade a drogas têm sido amplamente estudados, como marcadores fenotípicos importantes para identificação de linhagens (MULLIGAN; ARBEIT, 1991; KREISWIRTH et al., 1995).

A nova linhagem bacteriana de *C. violaceum* UCP 1552 apresentou resultado positivo para os seguintes testes bioquímicos: arginina (GUEVARA et al., 2007), ac. glutâmico, leucina, fenilalanina, triptófano, lisina, acetato, adonitol, citrato (DALL'AGNOL et al., 2008; GUEVARA et al., 2007), colistina, D-manitol, a. alfacetoglutárico, malonato e gama-glutamil e resultado negativo para os seguintes testes bioquímicos: prolina, L-prolina, fosfato, Beta-alose, dextrose, frutose, D-galactose, melibiose, sorbitol, sacarose (DALL'AGNOL et al., 2008; GUEVARA et al., 2007), ac. galacturônico, L-arabinose, L-ramnose, maltose (GUEVARA et al., 2007), ornitina (GUEVARA et al., 2007), uréia (MANJUNATH, 2007; GUEVARA et al., 2007) e esculina (MANJUNATH, 2007; GUEVARA et al., 2007), correspondendo a *Chromobacterium violaceum*, segundo Koneman (2006) (Tabela 1). As características bioquímicas observadas no presente estudo foram confirmadas pela literatura (BALLOWS et al., 1991; BAILEY; BARON, 1994; RETORI, 2000; DURÁN et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; ANTUNES, 2006; ANTUNES et al., 2009).

Susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma pelo método de Kirby-Bauer demonstrou resistência de *C. violaceum* à ampicilina, ampicilina-sulbactam e cefalotina e sensibilidade a amicacina, aztreonam, ceftazidima (JITMUANG, 2008; SLESACK et al., 2009), ceftriaxona, cefepime (BAKER et al., 2008; BOSCH et al., 2008), ciprofloxacina (MARTINEZ; MATTAR, 2007; JITMUANG, 2008; IJAYAN et al., 2008; BAKER et al., 2008), ertapenem (BAKER et al., 2008; BOSCH et al., 2008), gentamicina, imipenem (PÉREZ et al., 2007), meropenem (PÉREZ et al., 2007; IJAYAN et al., 2008), piperacilina-tazobactam (PÉREZ et al., 2007; IJAYAN et al., 2008; BOSCH et al., 2008), polimixina B, sulfatrimetoprim (MARTINEZ; MATTAR, 2007) e tigeciclina (Figura 1 e Tabela 2).

A literatura descreve que *C. violaceum* apresenta resistência à penicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, ampicilina (MARTINEZ; MATTAR, 2007; JITMUANG, 2008; IJAYAN et al., 2008), cefalotina (MARTINEZ; MATTAR, 2007), cefamandol e vancomicina (KAUFMAN et al, 1986; SUAREZ et al, 1986; GEORGHIOU et al, 1989; PONTE e JENKINS, 1992; HASSAN et al., 1993; ANTUNES, 2006; ANTUNES et al., 2009) e susceptibilidade ao cloranfenicol, tetraciclina e aos aminoglicosídeos (YU, 1999; ANTUNES, 2006; JITMUANG, 2008; IJAYAN et al., 2008; BAKER et al., 2008; BOSCH et al., 2008; ANTUNES et al., 2009; SLESACK et al., 2009), corroborando com os resultados obtidos para a nova linhagem do microrganismo estudado.

Este perfil de resistência pode ser explicado pelo pouco contato que essa espécie apresenta em relação aos antibióticos utilizados na prática clínica, não ocorrendo, portanto, uma pressão seletiva.

Produção de biossurfactante por *C. violaceum* UCP 1552 utilizando um planejamento fatorial

Segundo Batista et al., (2006), os critérios utilizados para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes possuem a habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m^{-1} e a capacidade de

estabilização da emulsão, mantendo-se pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 h (E_{24}) depois da sua formação.

Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante produzido exibiu uma excelente atividade tensoativa, reduzindo a tensão superficial da água de 71 para 26 mN/m no ensaio 11 do planejamento fatorial (triptona 0,5; milhocina 4,0 e óleo de soja pós-fritura 7,5%) após 72 horas de cultivo (Tabela 3). Estes resultados confirmam os dados reportados por Peypoux et al., (1999), Nitschke e Pastore (2006) e Barros et al., (2008).

Ensaio realizados com várias bactérias em diferentes meios de cultura apresentaram valores distintos de tensões superficiais, *Pseudomonas fluorescens* apresentou valores na redução da tensão em torno de 30 mN/m, utilizando petróleo como substrato (SILVA et al., 2009), culturas puras de *Corynebacterium aquaticum* (42,3 mN/m), mista de *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus* sp. (50,3 mN/m), mista de *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* (53,2 mN/m) e pura de *Bacillus subtilis* apresentando valores mais elevados (56,7 mN/m) em meio de cultura contendo glicose (40,0 g L⁻¹), NH₄NO₃ (50,0 mM), Na₂HPO₄ (3,0 mM), KH₂PO₄ (3,0 mM), CaCl₂ (7,0 µM), MgSO₄.7H₂O (0,8 mM), EDTA sódico (4,0 µM), e FeSO₄.7H₂O (2,0 mM) com 72 horas de crescimento (WEI et al., 2004; YEH et al., 2005; PINTO et al., 2009). No entanto, *Geobacillus stearothermophilus* apresentou valores em torno de 33 mN/m com 96 horas de cultivo em meio Luria Bertani com diferentes concentrações de cloreto de sódio e solução do metal cobre (PAZ et al., 2006).

O melhor resultado da capacidade emulsificante (E_{24}) foi observado na condição 11 (triptona 0,5; milhocina 4,0 e óleo de soja pós-fritura 7,5%), obtendo-se 68 e 66 % de emulsificação com petróleo e óleo motor respectivamente, no período de 72 horas (Tabela 3), apresentando resultados superiores ao encontrados por Paz et al., (2006) utilizando n-hexadecano.

Principais efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do surfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*

No diagrama de Pareto obtido (Figura 2) com efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, pode-se observar que a interação da milhocina com o óleo de soja pós-fritura exerceu um efeito positivo, e estatisticamente significativo sobre o aumento da tensão superficial, ou seja, desfavoreceu com significância estatística a redução da tensão superficial do líquido metabólico. O aumento do óleo de soja do nível inferior para o nível superior exerceu um efeito negativo, porém, estatisticamente significativo sobre o aumento da tensão superficial, ou seja, favoreceu com significância estatística a redução da tensão superficial. A triptona e milhocina isoladamente, assim como a interação da triptona com milhocina, e a interação com triptona e óleo de soja não exerceram efeitos significativos estatisticamente sobre a redução da tensão superficial. Estes resultados indicam que a *C. violaceum* apresenta um alto potencial biotecnológico para a produção de biossurfactantes com capacidade tensoativa e emulsificante.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos foi identificada uma nova linhagem de *Chromobacterium violaceum*, com resistência apenas para ampicilina, ampicilina-sulbactam e cefalotina. O biossurfactante produzido utilizando substratos alternativos (milhocina e óleo de soja pós-fritura), e de baixo custo demonstra resultados promissores para biorremediação, considerando a redução da tensão superficial e capacidade de emulsificação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CAPES, FACEPE, CNPq, e a Universidade Católica de Pernambuco pelo uso das instalações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. A. *Chromobacterium violaceum*: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato – PHA. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2006.

ANTUNES, A. A.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Suplemento especial, n. 1, p. 48-55, 2006.

ANTUNES, A. A.; ANTUNES, M. M.; BARROS, J. F.; ALVES da SILVA, C. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biochemical characterization of a new strain of *Chromobacterium violaceum* UCP 1552 in Pernambuco, Brazil. **Holos Environment**, p. 19, 2009.

BAILEY, SCOTTS; BARON, E. J. O.; PETERSON, L. R. **Diagnostic Microbiology**. Ninth edition. Mosby – year Book, p. 566-567, 1994.

BAKER, S.; CAMPBELL, J. I.; STABLER, R.; HOANG, V. M.; NGUYEN, D. S.; TO, D. V. N.; FARRAR, J. Fatal wound infection caused by *Chromobacterium violaceum* in Ho Chi Minh City, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3853-3855, 2008.

BALOWS, A.; HAUSLER Jr, W. J.; HERRMANN, K. L.; ISEMBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 5th ed. American Society for Microbiology, 1991.

BANAT, I. M.; Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, n. 198, p. 44-47, 2000.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA Jr., M. R.; PASTORE, G. M.; **Quim. Nova**, n. 30, p. 409, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol** v. 45, p. 493-496, 1966.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hidrocarbons. **Colloids and Surfaces**, n. 152, p. 41-52, 1999.

BOSCH, F. J.; BADENHORST, J. A.; LOUW, V. J. Successful treatment of *Chromobacterium violaceum* sepsis in South Africa. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1293-1295, 2008.

BRAZILIAN NATIONAL PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 1660–11665, 2003.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S.; Recent applications of biosurfactant as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262, 2004.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental Microbiology**, 53, 224 –229, 1987.

DALL' AGNOL, L. T.; MARTINS, R. N.; VALLINOTO, A. C. R.; RIBEIRO, K. T. S. Diversity of *Chromobacterium violaceum* isolates from aquatic environments of state of Pará, Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 678-682, 2008.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants, P. 65-97. In Kosaric, N.(ed.), **Biosurfactants: production, properties, applications**; KOSARIC, N., ed. Marcel Dekker, Inc., cap. 3, New York, N.Y., 1993.

DURÁN, N.; RETORI, D.; MENCK, C. F. M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 20, p. 38-43, 2001.

GEORGHIOU, P. R.; O'KANE G. M.; SIU, S.; KEMP, R. J. Near-fatal septicaemia with *Chromobacterium violaceum*. **Med J Aust**, v. 150, p. 720-721, 1989.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Rev. **Biotechnol. Ciênc. Desenvol.** v. 30, p. 39, 2003.

GUEVARA, A.; SOLOMÓN, M.; OLIVEROS, M.; GUEVARA, E.; GUEVARA, M.; MEDINA, Z. Sepsis por *Chromobacterium violaceum* pigmentado y no pigmentado, **Rev. Chil Infect**, v. 24, n. 5, p. 402-406, 2007.

HASSAN, H.; SUNTHARALINGAM, S.; DHILLON, K. S. Fatal *Chromobacterium violaceum* septicaemia. **Singapore Med J**, v. 34, p. 456-458, 1993.

JITMUANG, A. Human *Chromobacterium violaceum* infection in southeast Asia: case report and literature review. **Southeast Asian J Tropical Med Public Health**, v. 39, n. 3, 2008.

KEARNS, D. B. & LOSICK, R. Swarming Motility in Undomesticated *Bacillus Subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 581–590, 2003.

KAUFMAN, S. C.; CERAGO, D.; SCHUGURENSKY, B. First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. **J Clin Microbiol.** v. 23, p. 956-958, 1986.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido – 5. edição MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001.

KREISWIRTH, B.; LUTWICK, S. M.; CHAPNICK, E. K. et al., Tracing the spread of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* by Southern blot hybridization using genespecific probes of mec and Tn554. **Microb. Health Res.**, v. 1, p. 307-313, 1995.

KUYUKINA, M.S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 149-156, 2001.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n 1-2, p. 12-20, 2002.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology** – v. 52. USA: Academic Press, 2003. Cap. 4, p. 101-121.

MALLAWAARACHCHI, M. A. D.; KARUNARATNE, G. K. D.; SILVA, S. Two fatal cases of *Chromobacter violaceum* infection, **Sri Lanka Journal of Child Health**, v. 38, p. 70-71, 2009.

MANJUNATH, M. Fatal septicaemia due to *Chromobacterium violaceum*. **West Indian Med J**, v. 56, n. 4, p. 380, 2007.

MARÇAL, M. DO C. R. Produção de biopolímeros por *Cândida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 1991.

MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum* in a child from Colômbia. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 49, n. 6, p. 391-393, 2007.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y. & IMANAKA, T. A Study on the Structure - Function Relationship of Lipopeptide Biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.

MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Epidemiologic utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** v. 12, pag. 20-28, 1991.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NCCLS - National Committee For Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**, document M2-A8, 8th ed., NCCLS, Wayne, 58 p., 2003.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedade e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Produção de biossurfactantes em manipueira. Anais em CD-Room do XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química, Natal, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Bioresour. Technol.** v. 97, p. 336, 2006.

PAZ, M. C. F.; CEBALLOS, B. S. O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Influência de cloreto de sódio e de cobre na produção de biomassa e biossurfactante por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Suplemento especial, n. 1, p. 56-64, 2006.

PÉREZ, J. A. D.; GARCIAL, J.; VILLAMIZAR, L. A. R. Sepsis by *Chromobacterium violaceum*: first case report from Colombia, *BJID*, v. 11, 2007.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. xy, 2009.

PONTE, R. and JENKINS, S.G. Fatal *Chromobacterium violaceum* infection associated with exposure to stagnant water. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v.11, p. 583-586, 1992.

RETTORI, D. Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*. **Tese de Mestrado**, Instituto de Química, UNICAMP, 2000.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; TAKAKI, G. M. C. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando substratos de baixo custo. **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**. Recife-PE, 2005.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C. R.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P. C.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, p. 59-67, 2001.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. Progress in Energy and Combustion Science, disponível em www.elsevier.com/locate/pecs, acesso 4-09-2008.

SHEPERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.; ROLLER, S.; **J. Biotechnol.** v. 40, p. 207, 1995.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D. & WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99–121, 2007.

SILVA, T. A. L. et al., Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. **Exacta**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 31-37, jan./mar. 2009

SLESACK, G.; DOUANGDALA, P.; INTALAD, S.; SILISOUK, J.; VONGSOUVATH, M.; SENGDUANGPHACHANH, A.; MOORE, C. E.; MAYXAY, M.; MATSUOKA, H.; NEWTON, P. N. Fatal *Chromobacterium violaceum* septicaemia in northern Laos, a modified oxidase test and post-mortem forensic family G6PD analysis. **Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 24, 2009.

STATSOFT, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis softwaresystem), version 8. Disponível em www.statsoft.com. Acesso em 21/03/2009, 20:30:30.

SUAREZ A. E.; WENOKUR B.; JOHNSON J. M.; SARAVOLATZ, L. D. Nonfatal chromobacterial sepsis. **South Med J**, v.79, p. 1146-1148, 1986.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactants Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. **Zeitschrift fur Naturforsschung**, v. 57, p. 356-360, 2002.

VANCE-HARROP, M. H.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123, 2003.

VIJAYAN, A. P.; ANAND, M. R.; PREETHA REMESH. *Chromobacterium violaceum* sepsis in a infant. **Indian Pedriatics** 721, v. 46, 2009.

YU, V. L.; MERIGAN, J. R. T. C.; BARRIERE, S. L. **Antimicrobial therapy and vaccines**. Williams e Wilkins, 1999.

Tabela 1 – Resultados dos testes fermentativos e bioquímicos da *Chromobacterium violaceum* UCP 1552.

NEGATIVOS	POSITIVOS
Prolina	Arginina
L-prolina	Ácido glutâmico
Fosfato	Leucina
Beta- alose	Fenilalanina
Dextrose	Triptófano
Frutose	Lisina
Àc. Galacturônico	Acetato
L-arabinose	Odonitol
Maltose	Citrato
Ornitina	Colestina
Galactose	Manitol
Melibiose	Malonato
Sorbitol	Polimixina B
Uréia	Gama glutamil
Sacarose	Alfacto glutarico

Tabela 2- Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados por *Chromobacterium violaceum* UCP 1552.

SENSÍVEL	RESISTENTE
Amicacina	Ampicilina
Aztreonam	Ampicilina sulbactam
Ceftazidima	Cefalotina
Cetriaxona	
Cefepime	
Ciprofloxacina	
Ertapenem	
Imipenem	
Meropenem	
Gentamicina	
Piperacilina-tazobactam	
Polimixina B	
Sulfatrimetoprim	
Tigeciclina	

Tabela 3- Matriz do planejamento fatorial de 2^3 , com quatro pontos centrais, utilizando diferentes concentrações de triptona, milhocina e óleo de soja pós-fritura, sobre as variáveis respostas tensão superficial e índice de emulsificação por nova linhagem de *Chromobacterium violaceum* UCP 1552.

Ensaio	Triptona (%)	Milhocina (%)	Óleo de soja pós- fritura (%)	Tensão superficial mN/m	Índice emulsificação Petróleo (%)
1	0	2,0	5,0	27,26	35 %
2	0	2,0	10,0	27,07	50 %
3	0	6,0	5,0	26,94	56 %
4	0	6,0	10,0	27,42	61 %
5	1,0	2,0	5,0	26,98	52 %
6	1,0	2,0	10,0	27,13	52 %
7	1,0	6,0	5,0	26,87	50 %
8	1,0	6,0	10,0	26,88	66 %
9	0,5	4,0	7,5	26,59	58 %
10	0,5	4,0	7,5	26,98	65 %
11	0,5	4,0	7,5	26,26	68 %
12	0,5	4,0	7,5	27,20	57 %

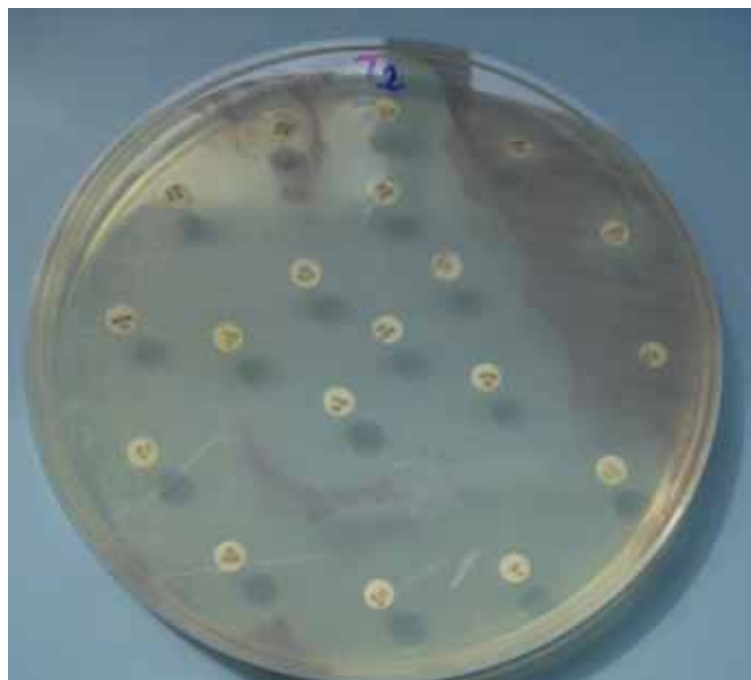


Figura 1 - Antibiograma realizado em linhagem de *Chromobacterium violaceum* UCP 1552.

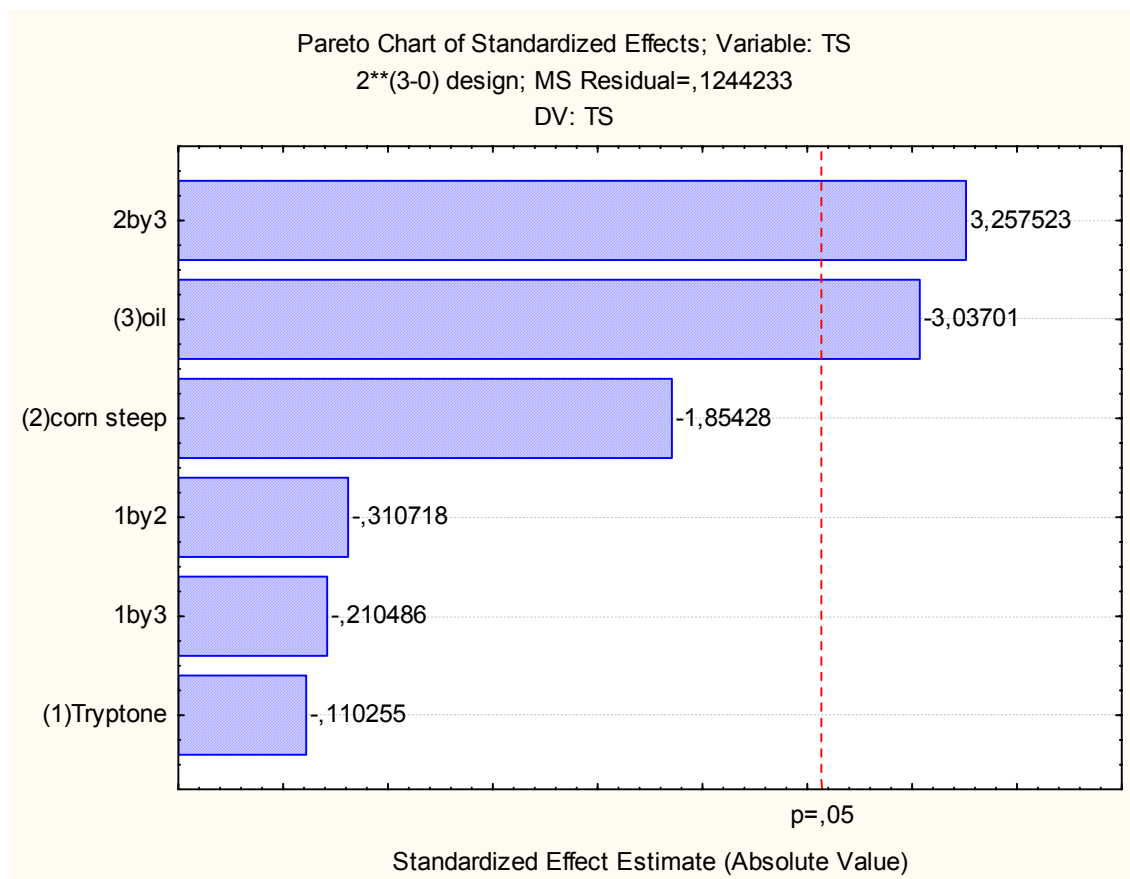


Figura 2- Diagrama de Pareto e os efeitos padronizados, utilizando triptona, milhocina e óleo de soja pós-fritura sobre a tensão superficial como variável dependente por *Chromobacterium violaceum* UCP 1552.

**Produção de biossurfactante por
Chromobacterium violaceum ATCC 12472
utilizando fontes alternativas: milhocina, lactose
e óleo de milho**

* Manuscrito a ser submetido para publicação no

American Journal of Agricultural and Biological Sciences

Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* UCP 12472 utilizando fontes alternativas: milhocina, lactose e óleo de milho

Adriana Almeida Antunes ^{1,4}; Helvia W. C. Araujo ^{2,4}; Carlos A. Alves-Silva ^{3,4}; Clarissa D. C. Albuquerque ⁴; Galba M. Campos Takaki ^{3,4}

¹Doutoranda em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil

²Doutoranda da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Recife, Brasil

³Universidade Católica de Pernambuco - Departamento de Química, Recife, Brasil

⁴Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) - Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), CEP 50050-590 Recife-Pernambuco-Brasil.

*Autor Correspondente: Galba Maria de Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 50050-900 Recife-Pernambuco, Brasil

RESUMO

O interesse em surfactantes de origem microbiana tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente devido ao seu potencial de aplicação. Os biossurfactantes têm sido testados em muitas aplicações ambientais e industriais, como na biorremediação, na dispersão de manchas oleosas e na recuperação de petróleo, substituindo os surfactantes químicos. Além disso, também podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética, detergentes e agrícola. No entanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes. Este trabalho tem como objetivo a produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum*, utilizando resíduo industrial, bem como avaliar a tensão superficial, índice e atividade de emulsificação. A tensão superficial por *C. violaceum* demonstrou valores entre 28 e 40 mN/m. No entanto, os melhores resultados foram observados nos ensaios de 8 e 12 utilizados no planejamento fatorial realizados com maior quantidade de óleo de milho, reduzindo a tensão de água de 71 mN/m para 28,98 e 28,36 mN/m, respectivamente. Os melhores resultados do índice de emulsificação foram observados nos ensaios de 10 e 11, resultando em 70,8% de emulsificação utilizando óleo de milho, no período de 72 h. A atividade emulsificante mostrou excelentes resultados em oleos pos-fritura (soja e milho), obtendo-se valores acima de 6 UAE (Unidades de Atividade de Emulsificação), utilizando óleo de milho em todas as condições do planejamento fatorial. O n-hexadecano também formou emulsão em todas as condições que variam entre 0,9 e valores acima de 6 UAE. Os resultados obtidos demonstram o potencial da *C. violaceum* na produção de biossurfactante.

Palavras-chaves: *Chromobacterium violaceum*, fontes alternativas, biossurfactante.

ABSTRACT

Interest in microbial surfactants has increased considerably in recent years, especially due to their potential of application. The biosurfactants have been tested in many environmental and industrial applications, such as in bioremediation, dispersion of oily stains and oil recovery, replacing the chemical surfactants. It also can be used in food, cosmetics, and detergents, and agricultural. However, increasing environmental awareness among consumers, combined with new legislation to control the environment led to the search for natural surfactants as alternatives to existing products. This paper aims to biosurfactant production by *Chromobacterium violaceum*, using industrial waste as well as evaluating the surface tension, index and activity of emulsification. The surface tension by *C. violaceum* showed values between 28 and 40 mN/m. However, the best result was observed in the assay 8 and 12 used in the factorial design carried out with greater amounts of corn oil, reducing the water tension of 71 mN/m to 28.36 mN/m, respectively. The best results of the emulsification index were determined in the assay 10 and 11 resulting in 70.8% of emulsification using the corn oil in the period of 72 h. Emulsifying activity shows excellent results in used oils (soybean and corn), obtaining values above 6 UAE (Units Emulsification Activity) using corn oil in all conditions of the factorial design. The n-hexadecane emulsion also formed in all conditions ranging between 0.9 and values above 6 UAE. These results indicate that the *C. violaceum* has higher potential for biosurfactant production.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*, alternative sources, biosurfactant

INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes constituem um grupo de diversas moléculas sintetizadas por microrganismos (NITSCHKE et al., 2005a; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

Estes biopolímeros podem ser classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004, MULLIGAN, 2005). As principais classes incluem fosfolipídeos, ácidos graxos hidroxilados, glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (LIN, 1996).

Podemos citar como principais propriedades dos biossurfactantes a redução da tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases e sua capacidade em misturar e dispersar substratos antes não solúveis, em soluções aquosas (BENINCASA et al., 2004).

Segundo a literatura, estes compostos oferecem diversas vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como: baixa toxicidade e alta biodegradabilidade; estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura; aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis em proteção ambiental e o fato de poderem ser produzidos a partir de fontes renováveis (BANAT et al., 2000; BENINCASA et al., 2002; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2002; MULLIGAN, 2005; NITSCHKE et al., 2005b; COSTA et al., 2006).

De acordo com Tuleva et al., (2002), os biopolímeros têm sido testados em muitas aplicações ambientais, como na biorremediação, na dispersão de manchas oleosas e na recuperação de petróleo, substituindo os surfactantes químicos. Além disso, também, podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética, detergentes e agrícola. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilizante e dispersão de fases (BANAT, 2000).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes

naturais como alternativas aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

O sucesso da produção de biossurfactante depende do desenvolvimento de processos que reduzam os custos de matérias-primas, já que estes são responsáveis por cerca de 30% de todo custo de produção. Apesar disso, poucos trabalhos têm sido publicados visando à produção de biossurfactantes a partir de resíduos, uma vez que a dificuldade se encontra na seleção e na composição adequada do resíduo a fim de que esta permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Este trabalho tem como objetivo a produção de biossurfactante analisado de acordo com a variável resposta tensão superficial assim como suas propriedades emulsificantes de acordo com o índice e atividade de emulsificação por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 em meio alternativo utilizando milhocina, lactose e óleo de milho pós-fritura como fontes alternativas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

No presente estudo foi utilizado o isolado padrão de *Chromobacterium violaceum*, ATCC 12472. A linhagem está depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP/PE, Brasil, sendo mantida em meio Agar Luria Bertani modificado (3 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 5 g/L cloreto de sódio; 5 g/L de glicose e 17 g/L de Agar) a 5° C. Para manter a viabilidade do microrganismo, repiques mensais foram realizados para o mesmo meio, sendo incubados a 30° C, e posteriormente, mantidos à temperatura de 5° C.

Substratos

Os substratos utilizados foram milhocina (proveniente da indústria Corn de beneficiamento de milho), lactose e óleo de milho adicionado em água

destilada e utilizado como meio de produção segundo as condições estabelecidas de acordo com planejamento fatorial de 2^3 .

Meio do pré-inóculo

O pré-inóculo foi realizado transferindo-se células de *Chromobacterium violaceum* para o meio Caldo Luria Bertani (LB) modificado contendo 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 5g/L de cloreto de sódio e 5g/L de glicose, mantido à temperatura de 30°C por 12 horas a 150 rpm, até obter uma DO_{600} inicial de 0,5 nm.

Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial completo de 2^3 , com 8 ensaios e 4 pontos centrais foi realizado para analisar os efeitos principais e interações das variáveis independentes, concentração de milhocina, concentração de lactose e concentração de óleo de milho sobre a variável resposta tensão superficial do líquido metabólico livre de células. A tabela 1 apresenta as variáveis e os níveis estudados no referido planejamento assim como a matriz decodificada.

Diagramas de Pareto - com nível de significância de 95 % - foram empregados para ilustrar as estimativas dos efeitos principais lineares e de segunda ordem, em valor absoluto, dos fatores em relação às variáveis respostas estudadas. No diagrama de Pareto, a magnitude de cada efeito é representada pelas colunas e a linha transversal às colunas corresponde ao valor de p igual a 0,05 e indica o quão grande deve ser o efeito para ter significado estatístico. O ponto no qual os efeitos estimados são significativos ($p=0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha. As significâncias dos efeitos foram testadas por análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas dos planejamentos experimentais, incluindo os diagramas de Pareto foram realizadas usando o programa Statistica® versão 8.0 (Statsoft.Inc, Tulsa/OK,USA).

Produção de Biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* utilizando fontes alternativas

Para a produção de biossurfactante foram realizadas fermentações em 12 frascos de Erlenmeyers com 250 mL de capacidade contendo 100 mL em diferentes concentrações de lactose (0,2 - 1,0 %), óleo de milho (5,0 – 7,5%) e milhocina (1,0 – 6,0%) e adicionados 3 mL do pré-inóculo com uma DO_{600} inicial de 0,5 nm. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 150 rpm, a 30°C durante 72 horas. Após esse período foi realizada uma centrifugação a 10000 x g, seguida de filtração em membrana de 0,22 μ m a fim de separar as células do líquido metabólico, onde o mesmo foi submetido à determinação da tensão superficial, índice e atividade de emulsificação.

Determinação do pH

Para a determinação do pH foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310), em alíquotas coletadas dos meios de produção em pH inicial e final de cultivo.

Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada através do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante e após 72 horas de cultivo foi medido em um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de DU NUOY, através de sua imersão no líquido, segundo metodologia descrita por Kuyukina et al., (2001).

Determinação do índice emulsificação

Para a determinação do índice de emulsificação, as amostras retiradas durante o processo fermentativo de 72 horas foram centrifugadas a 10000 x g durante 15 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Foram adicionados em um tubo graduado 1,0 mL de óleo de milho e 2 mL do líquido metabólico livre de células e a mistura

agitada em vórtex por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas (E_{24}) e o índice de emulsificação foi calculado dividindo-se a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicando-se por 100 para fornecer o percentual da emulsão formada no tubo.

Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras retiradas após 72 horas de fermentação foram centrifugadas a 10.000 x g, durante 15 minutos e filtradas em membrana de 0,22 μm , e em seguida, analisadas segundo a metodologia descrita por Cirigliano e Carman, (1984). Foram colocados 2,0 mL do líquido metabólico livre de células, adicionado a 2,0 mL do tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3), com 1,0 mL de n-hexadecano e óleo de milho em tubos graduados, e a mistura foi agitada em vórtex por dois minutos. Após 10 minutos de repouso, as emulsões formadas foram retiradas com o auxílio da pipeta de Pasteur, colocados em uma cubeta e posteriormente lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda a 540 nm. O resultado foi calculado por $\text{ABS} \times 2$, onde é representado por UAE (Unidade de Atividade de Emulsificação). Os testes foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 determinada pela tensão superficial

De acordo com Haba et al., (2000) e Batista et al., (2006), os critérios utilizados para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes são a habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m^{-1} e a capacidade de estabilização da emulsão, mantendo-se pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 horas (E_{24}) depois da sua formação. A tensão superficial do isolado de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 demonstrou valores entre 28 e 40 mN/m . No entanto, o melhor resultado foi observado no ensaio 12 do planejamento fatorial realizado, com concentrações de valores intermediários

(3,5% de milhocina, 0,6% de lactose e 6,25% de óleo de milho), reduzindo a tensão da água de 71 mN/m para 28,36 mN/m em 72 horas de cultivo (Tabela 1 e 2). O mesmo valor de 28,3 foi encontrado por Gouveia et al., (2003), em 96 horas de cultivo, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* em meio MRL mais glicose. Estes valores foram inferiores aos encontrados por Silva et al., (2009), onde foi utilizado o microrganismo *Pseudomonas fluorescens* em meio com petróleo encontrando o menor valor de 30,04 mN/m em 60 horas de cultivo. Pirrolo, (2006), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* encontrou valores em torno de 33 mN/n quando cultivados em ensaios com 20% de querosene e 30% de óleo diesel. Antunes et al., (2006), com o mesmo isolado de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 obteve resultados superiores em meio Luria Bertani suplementado com óleo de soja encontrando uma redução da tensão para 33,14 mN/m, Luria Bertani suplementado com óleo de canola para 33,4 mN/m, Luria Bertani suplementado com óleo de milho para 34,21 mN/m e Luria Bertani suplementado com glicose para 34,31 mN/m, todos com 72 horas de cultivo e Castro (2005), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* em meio MLR mais glicerol encontrou o menor valor de 44,6 mN/m em 96 horas de cultivo. Portanto, foi verificado que a utilização de substratos alternativos influenciou de forma positiva na redução da tensão superficial.

Efeitos das concentrações de milhocina, lactose e óleo de milho sobre a tensão superficial

No diagrama de Pareto de efeitos padronizados ilustrado na Figura 1, pode-se observar, para um nível de confiança de 95%, que as concentrações em níveis intermediários de milhocina (3,5%), lactose (0,6%) e óleo de milho (6,25%), foram as concentrações que mais favoreceram na redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células. A interação entre as variáveis independentes lactose e óleo de milho e milhocina separadamente, nesta ordem, produziram efeitos negativos, favorecendo com significância estatística, a redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células. Por outro lado, a interação entre lactose e o óleo de milho, óleo de milho separadamente, lactose separadamente e a interação da milhocina com óleo

de milho, nesta ordem, também produziram efeitos negativos, mas sem significância do ponto de vista estatístico, na redução da tensão superficial (Figura 1).

Propriedade emulsificante do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*

Um importante parâmetro de avaliação do poder de um emulsificante é o índice de Emulsificação (IE) e a estabilidade da emulsão (COOPER; GOLDENBERG, 1987; ABU-RUWAIDA et al., 1991; NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005). O melhor resultado do índice de emulsificação foi determinado pelas condições 10 e 11 obtendo-se 70,8% de emulsificação com o óleo de milho no período de 72h (Figura 2). Rocha et al., (2006; 2007), obtiveram resultados semelhantes de 71,79% e 16,5% de emulsificação com óleo de soja e querosene, respectivamente utilizando *Pseudomonas aeruginosa* em meio de suco de caju enquanto Bezerra, (2006), encontrou valores em torno de 64,29% utilizando querosene comercial com o mesmo microrganismo. Barros et al., (2008) observaram valores maiores de emulsificação em cinco emulsões: óleo de oliva (15,8%), babaçu (17,3%); algodão (17,6%); milho (26,0%) e gergelim (62,9%). Bueno, (2008) obteve valores em torno de 48,8% com *Bacillus subtilis* utilizando tolueno. Barbosa e Paz, (2007), também utilizaram a *Chromobacterium violaceum* e encontraram valores inferiores (43,3%) no período de 60 horas após 2 minutos de repouso e 8,33% em 24 horas de repouso utilizando óleo de pequi. Wei et al., (2005), utilizaram diferentes fontes de substratos como fonte de carbono, entre elas, óleo de girassol, óleo de semente de uva e glicose e obtiveram índices de emulsificação entre 70% e 80% para o querosene, valores esses iguais ou superiores aos obtidos neste trabalho. A atividade de emulsificação mostra excelentes resultados no óleo de milho utilizado, obtendo valores acima de 6 UAE (Unidades de Atividade de Emulsificação) com óleo de milho em todas as condições do planejamento fatorial. O n-hexadecano também formou emulsão em todas as condições variando entre 0,9 e valores acima de 6 UAE (Figura 3). Bueno, (2008), apresentou valores máximos de 0,72 UAE em meio contendo manitol em

Bacillus subtilis e Paz et al., (2006) encontraram valores máximos de 5,9 UAE utilizando *Geobacillus stearothermophilus* com n-hexadecano em 96 horas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram o potencial da *Chromobacterium violaceum* na produção de biossurfactante sendo eficiente tanto na redução da tensão superficial quanto em sua capacidade emulsificante indicando perspectivas futuras para aplicações na área de biorremediação.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CAPES, FACEPE, CNPq e a Universidade Católica de Pernambuco pelo uso das instalações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A. S. et al. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and deviation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 4, p. 315-324, 1991.

ANTUNES, A. A.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Suplemento especial, n. 1, p. 48-55, 2006.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 53, p. 495–508, 2000.

BARBOSA, M. M. C; PAZ, M. C. F. Produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi) II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa – PB, 2007.

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, 1071–1078, 2008.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R.; **Bior. Technol.** n. 97, p. 868, 2006.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, A., MORAES, I. O. **J Food Eng.**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.

BUENO, S. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese de Doutorado, 2008.

CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.

CASTRO, C. J. T. L. Avaliação da produção de raminolipídeos por bactérias isoladas de poços de petróleo. Dissertação de Mestrado, 53 p., 2005.

CIRIGLIANO, M. C. e CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 747-750, 1984.

COOPER, D. G. and GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224 – 229, 1987.

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, 87 p., 2005.

COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, n. 30, p. 39-45, 2003.

HABA E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.

KUYUKINA, M. S., IVSHINA, I. B., PHILP, J. C., CHRISTOFI, N., DUNBAR, S. A., RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl extraction. **Journal of Microbiological Methods**. n. 46, p. 109-120, 2001.

LIN, S. C. Biosurfactants; recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 66, p. 109-120, 1996.

MAKKAR, R. S; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactante Production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 58, p. 428-34, 2002.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**. v. 133, p. 183-198, 2005.

NITSCHKE, M. Produção e caracterização de biosurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Tese de Doutorado, 88 p., 2004.

NITSCHKE, M., SIDDHARTHA, G. V. A. O., CONTIERO, J. Rhamnolipids Surfactants: An Update on the General Aspects of these Remarkable Biomolecules, **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005.

PAZ, M. C. F.; CEBALLOS, B. S. O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Influência de cloreto de sódio e de cobre na produção de biomassa e biossurfactante por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Suplemento especial, n. 1, p. 56-64, 2006.

PIROLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2006.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strain of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Prog.**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World J. Microbiol Biotechnol.**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. **4º PDPETRO**, Campinas, SP, p.1-10, 2007.

SILVA, T. A. L.; ARAUJO, H. W. C.; TAMBOURGI, E. B.; SILVA, C. A. A.; TAKAKI, G. M. C. Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. **Exacta**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 31-37, 2009.

STATSOFT, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis softwaresystem), version 8. Disponível em www.statsoft.com. Acesso em 21/03/2009, 20:30:30.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactants Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. **Zeitschrift fur Naturforsschung**, v. 57, p. 356-360, 2002.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid Production by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 Originating from Petrochemical Wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

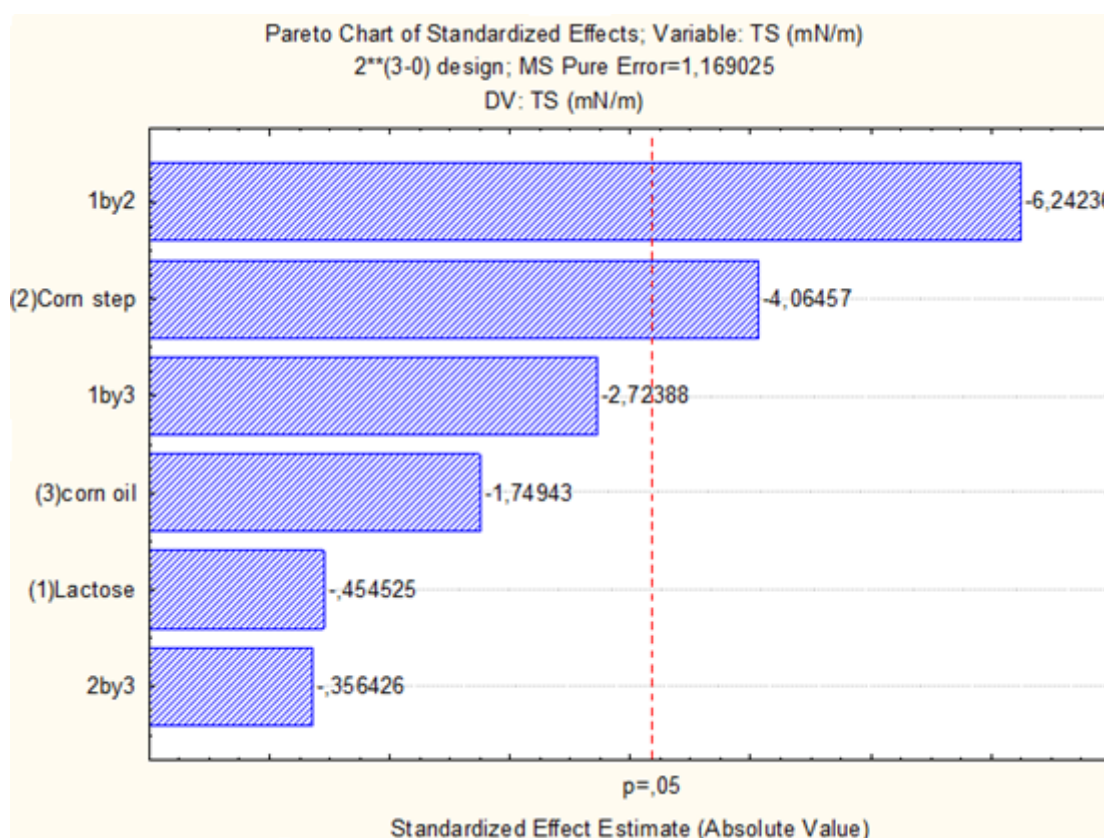


Figura 1 – Diagrama de Pareto de efeitos padronizados, em meio milhocina, lactose e óleo de milho por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando a tensão superficial como variável resposta.

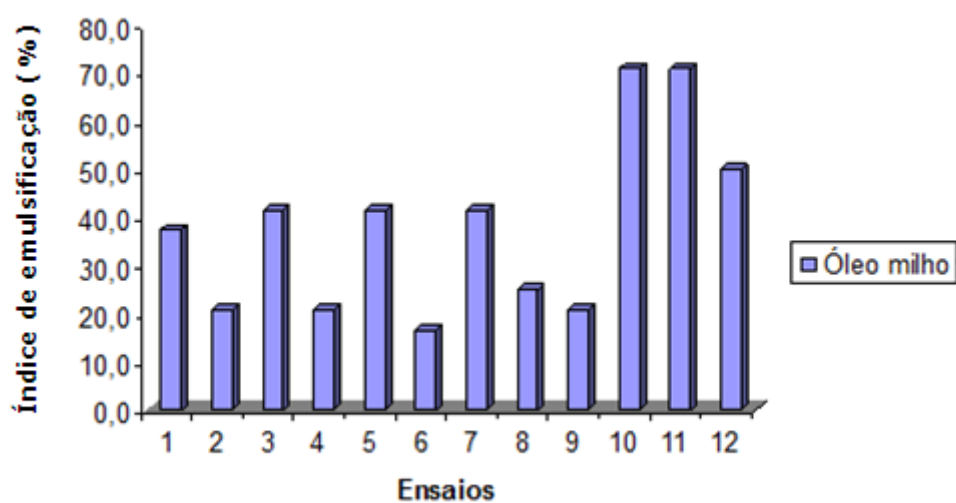


Figura 2 – Resultado do processo fermentativo determinado pelo índice de emulsificação por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 em óleo de milho.

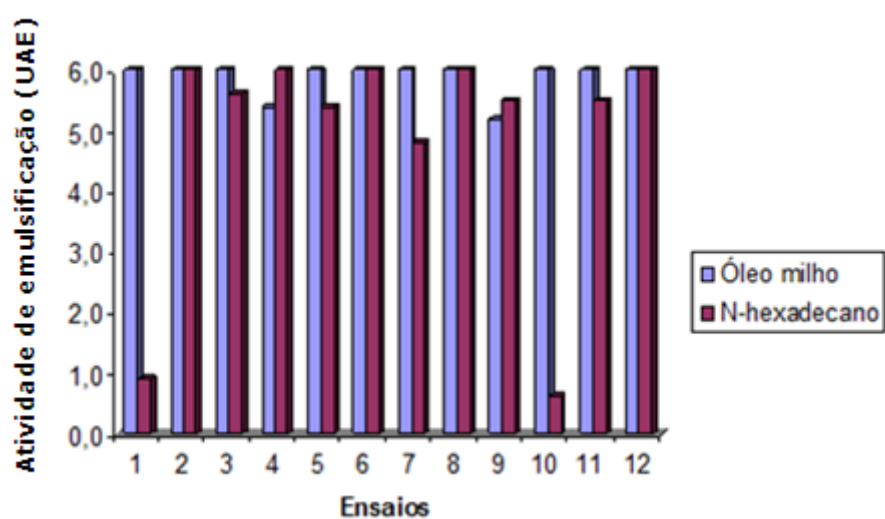


Figura 3 – Atividade emulsificante utilizando óleo de milho e n-hexadecano por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

Tabela 1 – Valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central

Variável Independente	Nível		
	-1	0	+1
Milhocina (g/L)	1,0	3,50	6,0
Lactose (g/L)	0,2	0,60	1,0
Óleo de milho (10^{-3} L)	5,0	6,25	7,5

Tabela 2 – Matriz decodificada do planejamento fatorial de 2^3 e os resultados da tensão superficial nos meios de produção.

Ensaio	Milhocina	Lactose	Óleo de milho	T. Superficial
	(%)	(%)	(%)	(mN/m)
1	1	0,2	5	31,04
2	1	1	5	40,28
3	6	0,2	5	35,71
4	6	1	5	29,94
5	1	0,2	7,5	34,79
6	1	1	7,5	34,40
7	6	0,2	7,5	33,45
8	6	1	7,5	28,98
9	3,5	0,6	6,25	30,77
10	3,5	0,6	6,25	29,56
11	3,5	0,6	6,25	30,46
12	3,5	0,6	6,25	28,36

**Produção de biossurfactante por
Chromobacterium violaceum UCP 1463 utilizando
milhocina e glicerina como meio de baixo custo**

*** Manuscrito a ser submetido para publicação no
Applied and Environmental Microbiology**

Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 utilizando milhocina e glicerina como meio de baixo custo

Adriana Almeida Antunes^{1,5}; Rosileide Fontenele da Silva Andrade^{2,5}; Valdemir Alexandre dos Santos⁴; Ligia Marone Rodrigues³; Jose Antonio Couto Teixeira³; Galba Maria de Campos-Takaki⁵

¹Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil

²Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, Brasil

³Universidade do Minho - Departamento de Engenharia Biológica, Braga, Portugal

⁴Departamento de Engenharia Química, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil;

⁵Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB)-Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), CEP 50050-590 Recife-Pernambuco-Brasil.

*Autor Correspondente: Galba Maria de Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 50050-900 Recife-Pernambuco, Brasil

RESUMO

O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes. Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho foi a produção, isolamento, extração, pré-purificação e aplicação do biossurfactante produzido pelo microrganismo *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 utilizando como meio de produção e de baixo custo a milhocina (0,3%) e glicerina (0,782%), através de um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O biossurfactante foi definido como aniônico, com capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 26,7mN/m, apresentando um valor de concentração micelar crítica de 1,5%, capacidade de emulsificação (E_{24}) de 100% utilizando óleo queimado de motor e uma atividade emulsificante de 6 UAE utilizando óleo de soja. O teste de estabilidade foi avaliado pela tensão superficial, através do líquido metabólico livre de células, demonstrando estabilidade em todos os pH's, temperaturas e em altas concentrações de NaCl. O biossurfactante produzido por *C. violaceum* UCP 1463 foi caracterizado como complexo polimérico apresentando 50% de carboidratos, 21% de lipídios e 17% de proteínas. O biossurfactante foi testado em duas concentrações (0,001 e 0,01%), demonstrando toxicidade para a *Artemia salina* e não apresentando atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados. O biossurfactante produzido foi capaz de remover 86% do óleo queimado de motor presente em solo arenoso, demonstrando um grande potencial em processos de biorremediação.

Palavras-chaves: *Chromobacterium violaceum*; meios de baixo custo; biossurfactante

ABSTRACT

The economic problem of biosurfactant production can be significantly reduced through the use of alternative sources of nutrients. In this sense, the main objective of this work was the production, isolation, extraction, purification and pre-application of the biosurfactant produced by the microorganism *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 using as inputs and low cost of corn steep liquor (0.3%) and glycerin (0.782%), through an experimental design type central composite rotational design (DCCR). The biosurfactant was defined as ionic, capable of reducing the surface tension of water from 72 mN / m to 26.7 mN/m, with a micelar critical concentration value of 1.5%, emulsifying capacity (E24) 100% using burnt oil engine and an emulsifying activity of 6 UAE using soybean oil. The stability test was evaluated by surface tension through the net metabolic cell-free, demonstrating stability at all pH's, temperatures and high concentrations of NaCl. The biosurfactant produced by *C. violaceum* was characterized as polymeric complex featuring 50% carbohydrates, 21% lipids and 17% protein. The biosurfactant was tested in two concentrations (0.001 and 0.01%), demonstrating toxicity to *Artemia salina* and had no antimicrobial activity against microorganisms tested. The biosurfactant produced was able to remove 86% of the oil burning engine in this sandy soil, showing a great potential in bioremediation processes.

Key-words: *Chromobacterium violaceum*; low cost medium; biosurfactant

INTRODUÇÃO

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia facultativa que vive em regiões tropicais, geralmente em solos e rios. No Brasil é encontrada principalmente às margens do Rio Negro, na Amazônia. Escolhida para o sequenciamento do seu genoma no Projeto Genoma Nacional Brasileiro (VASCONCELOS et al., 2003), esta bactéria destaca-se por apresentar um grande potencial para aplicações biotecnológicas diversas. Uma das características mais marcantes da *C. violaceum* é a produção, dentre outros metabólitos, de um pigmento de cor violeta, chamado violaceína, e suas propriedades terapêuticas tem sido objeto de estudo desde a década de 1970 (CALDAS et al., 1978; DURÁN et al., 1989; DURAN; MENCK, 2001; HUNGRIA et al., 2004). Apesar de seu potencial biotecnológico, poucos estudos vêm sendo realizados para verificar sua capacidade na produção de biossurfactantes.

Surfactantes são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou biossurfactantes, produzidos por microrganismos (KIM et al., 2000). Eles possuem uma porção hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico que é fortemente atraído pelo meio aquoso (MULLIGAN, 2005). Usualmente, o domínio hidrofóbico é um hidrocarboneto, enquanto que o hidrofílico pode ser não-iônico, iônico (catiônico ou aniônico) ou anfotérico. Por serem anfifílicos, são moléculas ativas de superfície, ou seja, ao serem adicionados em sistemas água-óleo ou água-ar se posicionam na interface, direcionando suas regiões de acordo com as afinidades das mesmas para com os componentes do sistema (SABATINI et al., 2006). São compostos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, e por isso permitem misturar ou dispersar imediatamente como emulsões em água ou outros líquidos (BANAT et al., 2000). Apesar de apresentar diversas vantagens sobre os surfactantes químicos, os surfactantes microbianos ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos inefficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros (KOSARIC, 1992, ROCHA et al., 2006). Por outro lado, um

grande número de substratos alternativos têm sido sugeridos (KOSARIC et al., 1984; MERCADÉ, 1994; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002), especialmente resíduos agrícolas miscíveis em água como o soro de leite, manipueira (água derivada da prensagem de mandioca) ou resíduos de destilarias (BABU et al., 1996; PATEL; DESAI, 1997; DANIEL et al., 1998 e 1999; COPPEDE et al., 2005; LIMA et al., 2005, NITSCHKE; PASTORE, 2006). No entanto, exemplos são encontrados do uso de resíduos hidrofóbicos como o óleo residual de frituras (HABA et al., 2000; JACKISCH-MATSURA; DURRANT, 2005), óleo lubrificante usado (MERCADÉ et al., 1996) e borra oleosa de refinarias de petróleo (PIRÔLLO, 2006). Deste modo, muitos estudos relacionados aos biossurfactantes, atualmente, referem-se à busca de fontes de matérias primas alternativas como uma das possibilidades de diminuição de custos de produção (MARIANO et al., 2006d), além da sua elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade, característica que os diferencia notavelmente de outros tensoativos químicos (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008; WHANG et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo principal do estudo foi a produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum*, UCP 1463, utilizando a milhocina e glicerina como meio alternativo e de baixo custo.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

No presente estudo, o microrganismo utilizado foi a *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 isolado em amostras de solo na região Amazônica. A linhagem está depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP - PE, Brasil, sendo mantida em meio ágar Luria Bertani (LB) modificado (3 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 5 g/L cloreto de sódio; 5 g/L de glicose e 17 g/L de Agar) a 5° C. Para manter a viabilidade do microrganismo, repiques mensais foram realizados para o mesmo meio, sendo incubados a 30° C, e posteriormente, mantidos à temperatura de 5° C.

Substratos

Os substratos utilizados foram a milhocina e glicerina provenientes da indústria Corn de beneficiamento de milho e do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), respectivamente, adicionados em água destilada e utilizados como meio de produção segundo as condições estabelecidas de acordo com planejamento experimental de 2^2 .

Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento experimental completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 2^2 , com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para analisar os principais efeitos e interações das variáveis concentrações de milhocina e glicerina sobre a variável resposta tensão superficial. A matriz do planejamento codificada e os valores das variáveis independentes nos níveis -1,44, +1,44, -1, +1 e o ponto central encontram-se na tabela 1 e 2. A análise dos principais efeitos e interações das variáveis concentrações de milhocina, lactose e óleo de milho pós-fritura foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 7.0 da Statsoft, USA (STATSOFT, 2001).

O ajuste das respostas experimentais a um modelo de segunda ordem, o qual tem a forma:

$$y = \beta_0 + \sum_j \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_j \beta_{jj} x_j^2 + e$$

é uma das vantagens do uso de um DCCR. Em geral, num DCCR com dois níveis originais, tem-se 2^K pontos fatoriais + $2 \cdot K$ pontos axiais + um número arbitrário de pontos centrais (ASLAN, 2007; MONTGOMERY; BETTENCOURT, 1997).

Pré-inóculo

O pré-inóculo foi realizado transferindo-se células de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 para o meio Caldo Luria Bertani (LB) modificado contendo 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 5g/L de cloreto de sódio e 5g/L de glicose, mantido à temperatura de 30°C por 12 horas a 150 rpm, até obter uma DO₆₀₀ inicial de 0,5 nm.

Fermentação submersa

Para a produção de biossurfactante foram realizadas fermentações em frascos de Erlenmeyers com 250 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de produção (milhocina e glicerina) e adicionados 5 mL do pré-inóculo com uma DO₆₀₀ inicial de 0,5 nm. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 150 rpm, a 30°C durante 72 horas. Após esse período o meio foi centrifugado a 4200 rpm, seguida de filtração em membrana de 0,22 µm a fim de separar as células do líquido metabólico, onde o mesmo foi submetido à determinação da tensão superficial, índice e atividade de emulsificação e pH.

Cálculo da Razão C/N

O cálculo da razão C/N foi baseado na determinação da quantidade de carbono na fórmula química do glicerol (C₃H₈O₃), correspondente a 39,1%, e na quantidade de nitrogênio na fórmula química do NaNO₃, equivalente a 19,2%. Assim, calcularam-se as concentrações de carbono e de nitrogênio multiplicando-se as proporções percentuais pelas respectivas concentrações de glicerol e de nitrato de sódio (SOUSA, 2008).

Cinética de crescimento

O crescimento de *Chromobacterium violaceum* foi acompanhado através da densidade óptica ao comprimento de onda de 600 nm e pela determinação da tensão superficial. Inicialmente as alíquotas foram coletadas a cada 4 horas,

nas primeiras 12 horas, e posteriormente foram coletadas a cada 24 horas ao total de 120 horas.

Determinação da estabilidade

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada a partir da condição selecionada do planejamento experimental completo (DCCR), de acordo com a determinação da tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células utilizando as temperaturas de 0°C, 5°C, 70°C, 100°C e 120°C, concentrações de NaCl de 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12% e pH's de 2, 4, 6, 8, 10 e 12, por 15 minutos.

Determinação do pH

Para a determinação do pH foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310), através de alíquotas coletadas dos meios de produção em diferentes períodos de tempos.

Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada através do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante e após 72 horas de cultivo foi medido em um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de Du Nuoy, através de sua imersão no líquido, segundo metodologia descrita por Kuyukina et al., (2001).

Determinação do índice emulsificação

Para a determinação do índice de emulsificação, as amostras retiradas ao longo do processo fermentativo foram centrifugadas a 10 000 X g durante 15 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Foram adicionados em um tubo graduado 1,0 mL de diferentes substratos hidrofóbicos (óleo pós-fritura, petróleo, óleo de soja, óleo

motor e óleo de canola) e 2 mL do líquido metabólico livre de células e a mistura agitada em vórtex por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas (E_{24}) e o índice de emulsificação foi calculado dividindo-se a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicando-se por 100 para fornecer o percentual da emulsão formada no tubo.

Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras retiradas após 72 horas de fermentação foram centrifugadas a 10 000 X g, durante 15 minutos e filtradas em membrana de 0,22 μm , e em seguida, analisadas segundo a metodologia descrita por Cirigliano e Carman, (1984). Foram colocados 2,0 mL do líquido metabólico livre de células, adicionado a 2,0 mL do tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3), com 1,0 mL de n-hexadecano, óleo de soja, milho e óleo de algodão em tubos graduados, e a mistura foi agitada em vórtex por dois minutos. Após 10 minutos de repouso, as emulsões formadas foram retiradas com o auxílio da pipeta de Pasteur, colocados em uma cubeta e posteriormente lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda a 540 nm. O resultado foi calculado por $\text{ABS} \times 2$, onde e representado por UAE (Unidade de Atividade de Emulsificação). Os testes foram realizados em triplicata.

Isolamento e caracterização do biossurfactante

O biossurfactante produzido na condição selecionada do planejamento experimental completo (DCCR), selecionada através da menor tensão superficial, foi extraído e pré-purificado através de duas metodologias: a primeira isolada por precipitação através da acidificação e pré-purificada com clorofórmio - metanol e a segunda isolada por precipitação com sulfato de amônio e pré-purificada pela diálise, para avaliar o método de extração mais eficiente.

Extração por acidificação e pré-purificação por solventes

Para extração do biossurfactante o líquido metabólico livre de células foi acidificado com ácido clorídrico a 2N para o pH 2 e deixado em *overnight* a 4°C. Posteriormente o líquido metabólico foi centrifugado a 10 000 X g durante 15 minutos, filtrado em membrana de 0,22 µm e em seguida, mantidos em placas de Petri a temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foi adicionado ao líquido metabólico livre de células clorofórmio - metanol 2: 1: 3 (clorofórmio: metanol: sobrenadante). A espuma formada, contendo o biossurfactante foi separada em funil de separação e seca em temperatura ambiente em rotaevaporador. Outra fase, após extração com clorofórmio - metanol e evaporação, foi lavada duas vezes com hexano, numa tentativa de eliminar o máximo de resíduos que pudessem estar presentes no extrato bruto. Foi novamente seca e em seguida, mantidos em placas de Petri a temperatura ambiente até peso constante (HOROWITZ; GILBERT.; GRIFFIN, 1990).

Extração por precipitação com sulfato de amônio e pré-purificação por diálise

Adicionou-se sulfato de amônio ao sobrenadante até se atingir 70% de saturação. O material foi deixado em repouso por 24h a 4°C. Após esse período fez-se a centrifugação a 10 000 X g por 15min. A diálise da amostra foi realizada com água deionizada por 24h, com trocas a cada 4h para a remoção do sal aderido ao biossurfactante. O precipitado foi recolhido e liofilizado (NAVON-VENEZIA et al., 1995).

Determinação da carga iônica do biossurfactante produzido

A determinação da carga iônica do biossurfactante foi avaliada pela técnica de difusão dupla em Ágar com baixa viscosidade (solução a 1%) segundo Meylheuc et al., 2001. Após distribuição do Agar em placa de Petri, foram feitas 3 fileiras com poços regularmente espaçados, onde os poços da fileira mediana foram preenchidos com a solução de biossurfactante isolado na concentração

de 0,001%, os poços da fileira superior com um composto puro de carga iônica conhecida. A substância aniônica conhecida foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02 M e a substância catiônica foi o cloreto de bário a 0,05M. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 48h horas e após esse período foi realizada a leitura através do surgimento de linhas de precipitação.

Composição química

Para a determinação da composição do biossurfactante produzido foram utilizados o kit Labtest (Brasil) para determinação de proteínas, fenol ácido-sulfúrico para carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e lipídios após extração com clorofórmio-metanol e precipitação com sulfato de amônio, segundo a metodologia descrita por Manocha, (1980).

Espectrometria no Infravermelho com transformação Fourier

O material obtido foi analisado usando um Espectrômetro infravermelho FT-IR, com transformada de Fourier (FT-IR) em aparelho Bruker IFS 66, utilizando-se pastilhas KBr, sendo os números onda expressos em cm^{-1} na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

Atividade antimicrobiana

Foram realizados ensaios antimicrobianos utilizando placas de ágar nutriente com os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Candida albicans*, obtidos por uma suspensão de células padronizadas na concentração aproximada de 10^6 UFC/mL, utilizando discos de papel (papel de filtro) com 6 mm de diâmetro, embebidos com 10 μL da solução do biossurfactante em concentrações de 0,001% e 1%, incubados à 30° C por 24 horas para bactérias e 28° C por 2-5 dias para fungos e leveduras (CANG, 1999; CANG et al.; 2000). Os testes foram realizados em duplicata para todas

as linhagens e após o período de incubação, foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição de cada disco.

Teste de toxicidade

O teste de toxicidade do biossurfactante foi realizado com o microcrustáceo *Artemia salina* e foi baseado na porcentagem de morte dos organismos em relação ao seu número total (10 larvas), na presença de diferentes concentrações da solução de biossurfactante (v/v de 25, 50 e 75 %), diluídas em 5 mL de uma solução aquosa de sal marinho sintético (33,3 g/L), incubados por 24 horas. O volume máximo da amostra teste (líquido metabólico) foi de 1,5 mL (MC LAUGHLIN et al., 1985). Em seguida, foi realizada a contagem dos organismos vivos, determinando assim a dose limite (CL_{50}) dos líquidos metabólicos. Os testes foram realizados em duplicata.

Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo

O teste de biorremoção de óleo queimado de motor foi realizado utilizando solo arenoso, proveniente da praia de Boa Viagem (Recife-PE). O tratamento foi realizado com o líquido metabólico livre de células, contendo o biossurfactante, onde 150 mL do líquido foi adicionando a uma mistura de 5 mL de óleo queimado de motor em 20g de areia de praia em Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram realizados em duplicata e submetidos à agitação de 150 rpm por 48 horas, a 30° C (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa na área dos biossurfactantes tem se expandido muito nos últimos anos pelo seu uso potencial em diferentes áreas, ainda mais, no que se refere à proteção do meio ambiente (SANTA ANNA et al., 2002). Segundo Hester, (2001), os surfactantes microbianos poderiam representar 10% do mercado de surfactantes com a vantagem de poderem ser produzidos utilizando procedimentos e substratos relativamente baratos e simples (LANG;

WULLBRANDT, 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002), buscando assim, a otimização do meio de cultivo e do processo para sua viabilidade econômica, uma vez que a matéria-prima representa cerca de 10 a 30% do custo geral da produção de biossurfactantes (LOBATO et al., 2003). A melhor condição do planejamento experimental (DCCR) foi obtida no meio de produção constituído de 0,782% de glicerina e 0,3% de milhocina (ponto axial), reduzindo a tensão da água de 72 mN/m para 26,7 mN/m em 72 horas de cultivo (Tabela 4) e atingindo uma CMC na concentração de 1,5% (Figura 2). A partir desta concentração de biossurfactante em solução, não houve maiores reduções da tensão superficial da água, permanecendo em 26,70 mN/m (Figura 1).

A habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/m⁻¹ é um critério utilizado para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes (HABA et al., 2000; BATISTA et al., 2006). No entanto, Mulligan, (2005), faz referência ao microrganismo *Rhodococcus erythropolis* demonstrando uma redução maior da tensão em torno de 26 mN/m. Valores próximos foram encontrados em *Rhodococcus rubber* AC 235 (26,8 mN/m) (MULLIGAN, 2005) e com *Bacillus subtilis*, na produção de um biossurfactante lipopeptídico conhecido como surfactina, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72,3 mN/m para 27 mN/m (COOPER, 1981; LIN et al., 1994; MORIKAWA et al., 2000; BARROS et al., 2007a; LIMA, 2008). A literatura cita valores de tensão superficial superiores encontrados com diversos microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa* em meio MRL mais glicose em 96 horas de cultivo (28,3 mN/m) (GOUVEIA et al., (2003); *Corynebacterium aquaticum* (28,8 mN/m), utilizando o líquido metabólico na presença de células (PINTO et al., 2009); *Pseudomonas fluorescens* em meio com petróleo em 60 horas de cultivo (30,04 mN/m) (SILVA et al., 2009); *Corynebacterium alkanolyticum*, ATCC 21511, utilizando n-hexadecano como substrato (32 mN/m) (CROSMAN et al., 2002); *Pseudomonas aeruginosa* em meio com 20% de querosene e 30% de óleo diesel (33 mN/n) (PIRROLO, 2006); *Chromobacterium violaceum* em meio Luria Bertani suplementado com óleo de soja (33,14 mN/m), Luria Bertani suplementado com óleo de canola (33,4 mN/m), Luria Bertani suplementado com óleo de milho (34,21 mN/m) e Luria Bertani suplementado com glicose (34,31 mN/m), todos com 72 horas de cultivo (ANTUNES et al., 2006);

Pseudomonas aeruginosa em meio MLR mais glicerol (44,6 mN/m) em 96 horas de cultivo (TABOSA, 2005); cultura mista de *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus* sp. (48,4mN/m); 54,8 mN/m cultura mista de *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* (54,8 mN/m) utilizando o líquido metabólico na presença de células e cultura pura de *Bacillus subtilis* (56,7 mN/m) (PINTO et al., 2009). De acordo com pesquisas realizadas por Mulligan, (2005), valores mínimos de tensão superficial podem ser encontradas tanto em surfactantes de origem sintética quanto em vários surfactantes de origem biológica tais como: *Rhodococcus erythropolis* – trealose tetraester (26 mN/m); *Rhodococcus rubber* AC 235 - glicolípido (26,8 mN/m); *Pseudomonas aeruginosa* - raminolípido (29 mN/m); *Bacillus subtilis* - surfactina (27 mN/m); brometo de cetiltrimetilamonio (30 mN/m); *Torulopsis bombicola* - soforolípido (33 mN/m); *Rhodococcus erythropolis* – trealose dicorinomicolato (36 mN/m) e dodecil sulfonato de sódio (SDS) (37 mN/m).

Produção extracelular do biossurfactante

Segundo Desai e Banat, (1997), os biossurfactantes podem ser liberados extracelularmente no meio de cultura ou permanecerem aderidos à célula do microrganismo. No entanto, sua produção é melhor evidenciada na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

A condição selecionada do planejamento experimental completo (DCCR) foi submetida a novas determinações de tensão superficial em três condições: líquido metabólico livre de células de *Chromobacterium violaceum*, líquido metabólico com a presença de células e líquido metabólico livre de células após extração do biossurfactante (SANTOS, 1997). Os valores de tensão superficial permaneceram inalterados tanto no líquido metabólico contendo células de *C. violaceum* quanto no líquido metabólico livre de células, comprovando a liberação extracelular do biossurfactante produzido por *C. violacem* (Figura 3). Os resultados obtidos foram confirmados por Santos, (1997), comprovando que após a extração do biossurfactante houve um aumento dos valores da tensão superficial do líquido metabólico livre de

células. Foi observada uma produção máxima de biossurfactante por *C. violaceum* em meio de produção contendo glicerina e milhocina em um período de 72 horas de cultivo, onde foi observada a redução da tensão superficial da água de 72 mN/m para 26,7 mN/m no ponto axial do planejamento experimental (DCCR) (Tabela 2).

Cinética de crescimento e tensão superficial

O processo de fermentação é importante para a produção de biossurfactante em larga escala, tanto em batelada quanto em cultura contínua, na fase estacionária ou exponencial (LANG, 2002). No presente estudo foi verificado que a redução da menor tensão superficial, através do líquido metabólico livre de células, foi verificada em 72 horas de cultivo, indicando a produção máxima do biossurfactante na fase estacionária (Figura 1).

Influência da fonte de carbono e nitrogênio

A máxima produção de biossurfactantes depende do correto balanço nutricional entre as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de cultivo (HOIL et al., 1999). No entanto, a influência destas fontes no meio de produção, são parâmetros importantes por influenciarem no tipo do biossurfactante produzido. A concentração do substrato empregado é responsável pelo aumento ou redução da síntese do biopolímero. Desta forma, vários estudos vêm sendo realizados empregando substratos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Em estudos realizados por Sousa, (2008), o cálculo da razão C/N é baseado na determinação da quantidade de carbono na fórmula química do glicerol ($C_3H_8O_3$), correspondente a 39,1 %, e na quantidade de nitrogênio na fórmula química do $NaNO_3$, equivalente a 19,2 %, obtendo uma relação C/N (86:59). Dessa forma, o meio de produção utilizado neste trabalho apresenta uma razão de C/N de 30:5,5 (glicerina: fonte de carbono e milhocina: fonte de nitrogênio).

Propriedade emulsificante do biossurfactante

Um importante parâmetro de avaliação do poder de um emulsificante é o Índice de Emulsificação (IE), onde pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 horas (E_{24}) permanece estável (COOPER; GOLDENBERG, 1987; ABU-RUWAIDA et al., 1991; HABA et al., 2000; NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005; BATISTA et al., 2006). A capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* foi testada em diferentes óleos (milho, canola, soja e queimado de motor) apresentando excelentes percentuais de emulsão variando entre 71% e 100% em todos os ensaios do planejamento experimental completo (DCCR) utilizando óleo queimado de motor em 72 horas de cultivo (Tabela 3). A atividade de emulsificação apresentou valores entre 2,82 até 6 UEA (Unidade de atividade emulsificante) (Tabela 4). *Pseudomonas aeruginosa* apresentou atividade emulsionante em vários hidrocarbonetos testados: óleo de soja, hexano, heptano, gasolina e querosene, sendo o óleo de soja (71,79% de emulsificação), enquanto o querosene (16,5% de emulsificação) o melhor e pior percentuais apresentados, utilizando suco de caju como meio de cultivo (ROCHA et al., 2007) e Bueno, (2008) com 48,8 % de emulsificação utilizando tolueno em 72 horas de cultivo, valores esses inferiores aos obtidos no presente estudo. A maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta (ILORI et al., 2005). As atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo e as produtividades nos cultivos de *Corynebacterium aquaticum* (2,65 e 0,40 UEA, respectivamente) e de *Bacillus subtilis* (2,40 e 0,38 UEA, respectivamente) foram próximas. Além disso, as maiores velocidades instantâneas de formação de produto relacionadas às atividades emulsificantes óleo em água (5,93 EUA) e água em óleo (0,83 EUA) também foram obtidas a partir da cultura de *Bacillus subtilis* (PINTO et al., 2009), apresentando resultados semelhantes ao referido estudo.

Estabilidade do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*

Fatores ambientais como salinidade, pH e temperatura afetam a atividade do biossurfactante (ILORI et al., 2005). O biopolímero produzido por *Chromobacterium violaceum*, selecionado na melhor condição do planejamento experimental completo (DCCR), foi avaliado através do líquido metabólico livre de células quanto a sua estabilidade em diferentes pH's (2, 4, 6, 8, 10, 12), temperaturas (0°C, 5°C, 70°C, 100°C, 121°C) e concentrações de NaCl (2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%) de acordo com a determinação da tensão superficial. O biossurfactante produzido mostrou uma excelente estabilidade da tensão superficial em todos os pH's (2, 4, 6, 8, 10, 12), em todas as temperaturas (0°C, 5°C, 70°C, 100°C, 121°C), e apenas em duas concentrações de NaCl (8% e 10%), demonstrando resultados significativos nas demais concentrações de NaCl testadas (2%, 4%, 6%, 12%), com tensão superficial de 30 mN/m (Figura 4). O biossurfactante produzido por *C. violaceum* apresentou maior estabilidade quando comparados aos surfactantes convencionais ao perder sua atividade tensoativa, em concentrações salinas de 2 a 3%, demonstrando a capacidade dos biossurfactantes em suportar concentrações de 10% de NaCl (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Através dos resultados obtidos por *Bacillus licheniformes* JF-2, pode-se observar que a tensão superficial diminuiu após exposição a altas temperaturas (100°C), por 75 minutos, ou quando submetida à esterilização em autoclave (121°C por 15 min). O lipopeptídeo é estável a temperaturas em torno de 75°C por 140 h e pH entre 5 e 12 (HOROWITZ et al., 1990).

Biossurfactantes que apresentam alta estabilidade frente a temperatura, pH e altas concentrações de sal, além de poderem ser utilizados em ambientes em condições mais drásticas, também podem ser utilizados em ambientes marinhos, independente da concentração de sal encontrada.

Composição química do biossurfactante selecionado

As condições de crescimento do microrganismo pH, temperatura, limitações como as de nitrogênio, oxigênio, ou elementos traços essenciais e as de recuperação do biossurfactante, centrifugação, ultrafiltração, precipitação, extração com solventes, adsorção por cromatografia podem influenciar no tipo e na quantidade do biossurfactante produzido (FIEBIG et al., 1997, CAMEOTRA; MAKKAR, 1998, KUYUKINA et al., 2001). O biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* é constituído por 50% de carboidratos, 21% de lipídeos e 17% de proteínas. Estes resultados não podem ser comparados a literatura devido a falta de pesquisas realizadas com a bactéria em estudo.

A identificação do *Bacillus pumilus* como produtor de um biossurfactante composto de carboidrato-lipídeo-proteína de alto peso molecular é extremamente importante, pois dados literários não indicam este tipo de composto produzido por *Bacillus* sp, mas biossurfactantes lipoprotéicos como a surfactina, iturina e bacilomicina e glicolipídeos como ramnolipídeos (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Isolamento e caracterização do biossurfactante

A etapa de isolamento do biossurfactante representa custos consideráveis para sua produção (DESAI; BANAT, 1997; IVSHINA et al., 1998). Cooper e Goldenberg (1987) já haviam verificado que dependendo do tipo de extração utilizado no caldo de cultura de *Bacillus cereus* (extração com clorofórmio ou ultrafiltração) foi obtido um polímero contendo D-glicosamina com boa atividade emulsificante ou uma mistura de homólogos de monoglicerídeos saturados com boa redução da tensão superficial. Através dos resultados obtidos foi verificado que a técnica com precipitação com sulfato de amônio com posterior pré-purificação através da diálise foi mais eficiente demonstrando ser o método mais viável em termo de custos e eficiente por remover a maior quantidade de impurezas presente no biossurfactante produzido (Figura 11).

Carga iônica do biossurfactante

Em geral, a estrutura dos biossurfactantes inclui uma porção hidrofílica que consiste de aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions; mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica consistindo de ácidos graxos saturados ou insaturados (SINGH; CAMEOTRA, 2004), onde a grande maioria apresenta caráter iônico ou neutro e alguns poucos catiônicos (MULLIGAN et al., 2001), destacando-se os carboxilados e ésteres sulfatados como surfactantes aniônicos mais utilizados em produtos de limpeza domésticos e industriais (BARBIERI, 2000).

De acordo com o teste de difusão dupla em ágar, observou-se o surgimento de linhas de precipitação entre o biossurfactante produzido por *C. violaceum* e o composto iônico Dodecil Sulfato de Sódio indicando o caráter aniônico do biossurfactante.

Os tensoativos aniônicos sulfonatos e sulfatos são conhecidos como aceleradores do processo de recuperação de óleos devido a sua tendência de reduzir a tensão interfacial, criar agregados óleo-tensoativo de carga negativa que repelem a superfície do solo e de melhorar as propriedades molhantes ao óleo da superfície do solo. Estes tensoativos possuem a vantagem, quando comparados aos não-iônicos, de adsorverem menos a superfície do solo, sendo facilmente recuperados após o uso e reutilizados.

Caracterização por espectrometria no infravermelho

A espectrometria ao raio infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizada para identificação de compostos orgânicos presentes no biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum*. O biopolímero foi quantificado, observando-se a presença do radical carbonila. Gartshore e Cooper (2000), em seus estudos, afirmam que a maioria dos biossurfactantes possui em sua estrutura um radical carbonila, composto por ligação éster ou ácido carboxílico os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético. No entanto, o biossurfactante produzido por *C. violaceum* apresentou, em sua composição, a presença do radical carbonila

constituído pelos dois grupamentos, tanto éster quanto ácido carboxílico (Figura 5 e 6).

Toxicidade do biossurfactante

Através do teste de toxicidade realizado com o microcrustáceo *Artemia salina*, foi observado a toxicidade do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* nas duas concentrações testadas a 0,001% e 1%.

Teste da atividade antimicrobiana

Vários biossurfactantes apresentam atividade antimicrobiana como os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* e glicolipídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* (LANG; PHILP, 1998; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). O teste da atividade antimicrobiana foi realizado nas mesmas concentrações do biossurfactante (0,001% e 1%) utilizadas para o teste de toxicidade. Foi observado que a presença do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* não inibiu o crescimento de nenhum microrganismo testado, não apresentando assim atividade antimicrobiana.

De acordo com pesquisas realizadas por Bueno, (2008), nenhum dos quatro *Bacillus* sp. e seus sobrenadantes, inoculados nas placas de Petri, apresentaram halos de inibição, indicando que não possuem atividade antibacteriana e antifúngica sobre os microrganismos testados.

Validação estatística dos resultados da produção do biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463

O modelo obtido de acordo com o programa statistica versão 7.0, indicou que os termos glicerina (efeito linear) e a milhocina (efeito quadrático) foram considerados significativos do ponto de vista estatístico (Figura 10). O reduzido valor para o erro puro (Tabela 5) demonstra um grande domínio sobre a técnica de medida da variável resposta tensão superficial (Figura 9). Isso reforça a

validade da utilização do DCCR, uma vez que este método não utiliza repetições para os pontos que não estejam no centro da estrela (configuração dos pontos), exigindo esse tipo de domínio (Tabela 1 e 2). Para definir as condições otimizadas utilizando um planejamento experimental do tipo DCCR, o domínio da técnica foi um ponto essencial, uma vez que a região de condições otimizadas está numa ampla faixa, dificultando o ajuste. Para tanto, foi necessário utilizar concentrações muito pequenas de glicerina a fim de estimar valores otimizados iniciais e se ter economia de material em uma possível aplicação da produção de biossurfactantes (Tabela 1 e Figura 8). A equação abaixo representa o modelo quadrático obtido:

$$Z = 63,237 - 39,673 * X + 26,9218 * X^2 - 124,434 * Y + 211,437 Y^2 - 9,2500 * X * Y$$

em que:

x= concentração de glicose; y= concentração de milhocina; z= tensão superficial

De acordo com o gráfico de superfície de resposta, verificou-se, que ao aumentar as concentrações de milhocina e reduzir as concentrações de glicerina, a variável resposta tensão superficial aumentou em concentrações elevadas de glicerina e níveis intermediários de milhocina, conseguiu-se alcançar a máxima redução da tensão superficial (Figura 7). O não paralelismo entre as curvas de nível demonstrou uma considerável interação entre os fatores, invalidando a explicação do fenômeno utilizando apenas um único fator (Figura 8). Observa-se no Diagrama de Pareto com os efeitos estimados para um nível de 95% de confiança, que a variável independente glicerina tanto no efeito linear (L) quanto no efeito quadrático (Q) e a milhocina no efeito quadrático (Q), influenciaram na tensão superficial, porém apenas a glicerina sob o efeito linear (L) foi a variável independente mais relevante, atuando na redução da tensão superficial.

O sinal negativo desta variável significa que a mesma atuou, com significância estatística, na redução da tensão superficial. O sinal positivo referente à milhocina (Q) e glicerina (Q) em efeito quadrático, significam que as variáveis

influenciaram na produção do biossurfactante, mas não atuaram na redução da tensão superficial (Figura 10). O programa forneceu o ponto crítico da função, onde o valor da tensão superficial é mínimo (26,7 mN/m), utilizando 0,754 de glicerina e 0,329 de milhocina.

Aplicação do biossurfactante isolado na remoção de óleo queimado de motor em solo arenoso

Vários trabalhos relatam o uso de surfactantes e biossurfactantes para remediação de solos contaminados (CLIFFORD et al., 2007; SONG et al., 2008; CZAPLICKA et al., 2008; WANG et al., 2008). De maneira geral, o uso de biossurfactantes se apresenta mais conveniente do que o uso de outros tensoativos químicos (dodecilsulfato de sódio), em razão da sua maior biodegradabilidade e menor toxicidade (MESQUITA, 2004) e da sua maior tolerância a variações de pH e temperatura (ASÇI et al., 2008).

De maneira geral, a água tem se mostrado ineficiente para remoção de poluentes hidrofóbicos (HANNAA et al., 2004; SHIN et al., 2006).

O líquido metabólico do biossurfactante isolado, a partir da melhor condição obtida no planejamento experimental completo (DCCR), foi aplicado em solo arenoso, (Boa Viagem – PE), contaminado com óleo queimado de motor, segundo metodologia descrita por Nitschke e Pastore (2002). O resultado da biorremoção apresentou valores significativos sobre a remoção do óleo queimado de motor em solo arenoso, obtendo 86% de remoção (Figura 12). Este valor também foi obtido por Abu-Ruwaida et al., (1991), para o líquido metabólico livre de células produzido por *Rhodococcus* de óleo bruto residual adsorvido em areia. Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por Joshi et al., (2007), utilizando *Bacillus* em resíduos (melaço e soro de queijo) removendo 30% do óleo contido em coluna, Cameotra e Makkar, (1998), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* removendo 56% do óleo adsorvido em areia contida em coluna e aos resultados obtidos por Kuyukina et al., (2005), utilizando *Rhodococcus* cultivado em n-hexadecano removendo 82% de óleo bruto residual adsorvido em areia.

Levando em consideração a literatura, e as características apresentadas pelo biossurfactante produzido no presente trabalho, pode-se dizer que o mesmo é adequado para aplicação em biorremediação, como por exemplo, em derramamento de petróleo e seus derivados em mares ou solos, uma vez que é estável na presença de altas concentrações de NaCl, na faixa de pH estudada e quando exposto a altas temperaturas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e a Universidade Católica de Pernambuco pelo uso das instalações.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A. S. et al. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and deviation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 4, p. 315-324, 1991.

ANTUNES, A. A.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Suplemento especial, n. 1, p. 48-55, 2006.

ASLAN, N. 2007. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling the influence of some operating variables of a Multi-Gravity Separator for coal cleaning. **Fuel**, 86:6, 769-776, 2007.

BANAT, I.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 53, p. 495-508, 2000.

BARBIERI, E., NGAN, P. V., GOMES, V. Efeito do LAS-C12 no metabolismo de rotinade tainhas em função da temperatura em três salinidades. In: **Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI**, 2000.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. De; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. e PASTORE, G. M. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-412, 2007.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R.; **Bior. Technol.**, 97, 868, 2006.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactant in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CIRIGLIANO, C.; CARMAN, G. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Cândida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p. 846-850, 1985.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N.; **Appl. Environ. Microbiol.**, 42, 408, 1981.

COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species **Applied and environmental Microbiology**, 53: 224 –229, 1987.

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Campinas, 87 p. Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2005.

CROSMAN, J. T.; PINCHUK, R. J.; COOPER, D. G.; **J. Am. Oil Chem. Soc.**,79, 467, 2002.

DESAI, J. D. & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 47-64. 1997.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 29, 350–356, 1956.

FANG, J.; BARCELONA, M. J. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Chemosphere**. v. 50, p. 105-109, 2003.

GARTSHORE J. D., LIM, Y. C., COOPER, D. G. Quantitative analysis of biosurfactants using FT-IR spectroscopy. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 169-172, 2000.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. Produção de biosurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. n. 30, p. 39-45, 2003.

HABA E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. M.; GRIFFIN, W. M. Isolation and characterization of a surfactant production by *Bacillus licheniformes*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 246-248, 1990.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v.61, p. 985-992, 2005.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 109-120, 2001.

LANG, S. WULLBRANDT, T. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p.22-32, 1999.

LANG, S.; PHILP, J. Surface-active Lipids in *Rhodococcus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 59-70, 1998.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants) **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. (2002) (No prelo).

LIN, S. C., GOURSAUD, J. C., KRAMER, P. J., GEORGIU, G., SHARMA, M. M. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. In: *Microbial Enhancement of Oil Recovery-Recent Advances* (Donaldson, E. C., Ed.), **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p. 219-226, 1990.

MAKKAR, R. S. e CAMEOTRA S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* Strains at thermophilic conditions. **Jaocs**. v. 74, n. 7, p. 887 – 889, 1997.

MAKKAR, R. e CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 58, p. 428–34, 2002.

MANOCHA, M. S., SAN- BLAS. G., CENTENO. S. Lipid composition of *paracciodioids brasilienses*: Possible correlation witer virulence of different strains. **Journal of General Microbioly. Condon**, v. 177, p. 147-154, 1980.

MC LAUGHLIN, J. L., SAIZARBITORIA, T. C., ANSERSON, J. E. Três bioensayos simples para químicos de produtos naturales. **Revista De La Sociedad Venezonalana de Química**, v. 18, p. 13-18, 1985.

MEYLHEUC, T.; VANOSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M. M. Adsorption of biosurfactants on soil surfaces and consequences regarding the bioahesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Apllied Microbioogy**, v. 91, p.822-832, 2001.

MONTGOMERY, D. C.; BETTENCOURT JR, V. M. Multiple response surface methods in computer simulation. **Simulation**, v. 29, p. 113 –121, 1997.

MULLER-HURTIG, R.; WAGNER F., BLASZCYK, R., KOSARIC, N. Biosurfactants for environmental control. In: Kosaric, N. (ed) Biosurfactants-Production, properties and applications. **Surfactant Science Series**. Eds. Marcel Dekker. New York, v. 48, p. 447-469, 1993.

MULLIGAN, C. N. Environmental application for biosurfactants. **Environ Pollut**; v. 133, p. 183–98, 2005.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y. e IMANAKA, T. A. Study on the Structure - Function Relationship of Lipopeptide Biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, volume 1488, p. 211-218, 2000.

NAVON-VENEZIA, S., ZOSIM, Z., GOTTLIEB, A., LEGMANN, R.; CARMELI, S., RON, E. Z., ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 3240-3244, 1995.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M. Produção e caracterização de biossurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Campinas, 88 p. Tese - (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

PIROLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2006.

PRIETO, L. M. Produção, caracterização parcial e aplicação de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado capturado no extremo sul do Brasil. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande – RS, 2007.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. **4º PDPETRO**, Campinas, SP, p.1-10, 2007.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences, **Trends Biotechnol.** v. 22, p. 142-146, 2004.

STATSOFT, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponível em www.statsoft.com. Acesso em 21/03/2009, 20:30:30

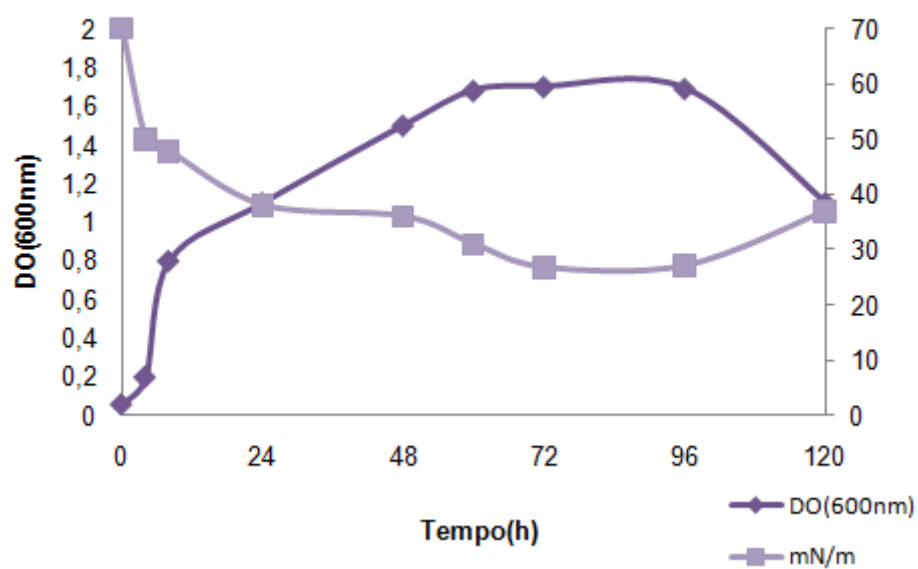


Figura 1- Curva de crescimento e tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 em meio de produção composto por milhocina e glicerina após 120 horas de cultivo.

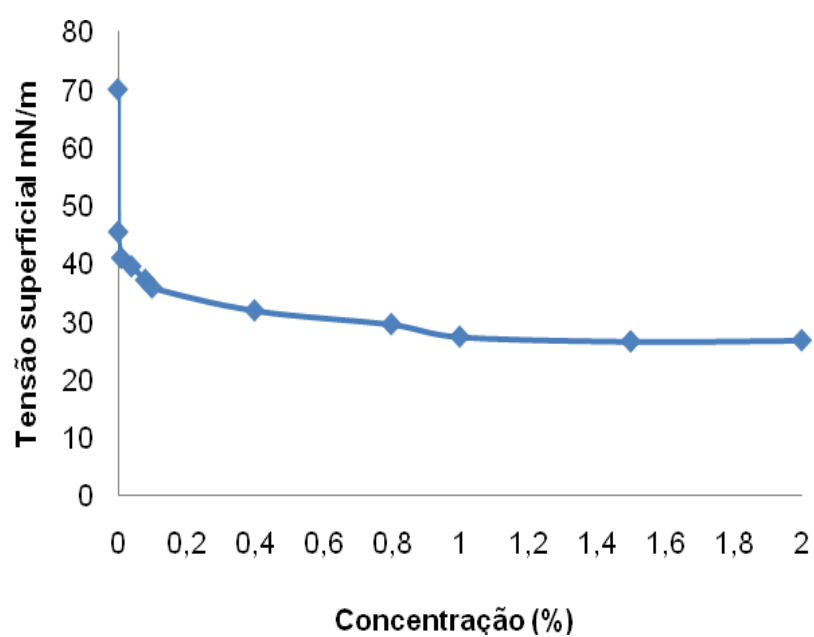


Figura 2- Concentração Micelar Crítica-CMC do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 após 120 horas de cultivo em meio composto por milhocina e glicerina.

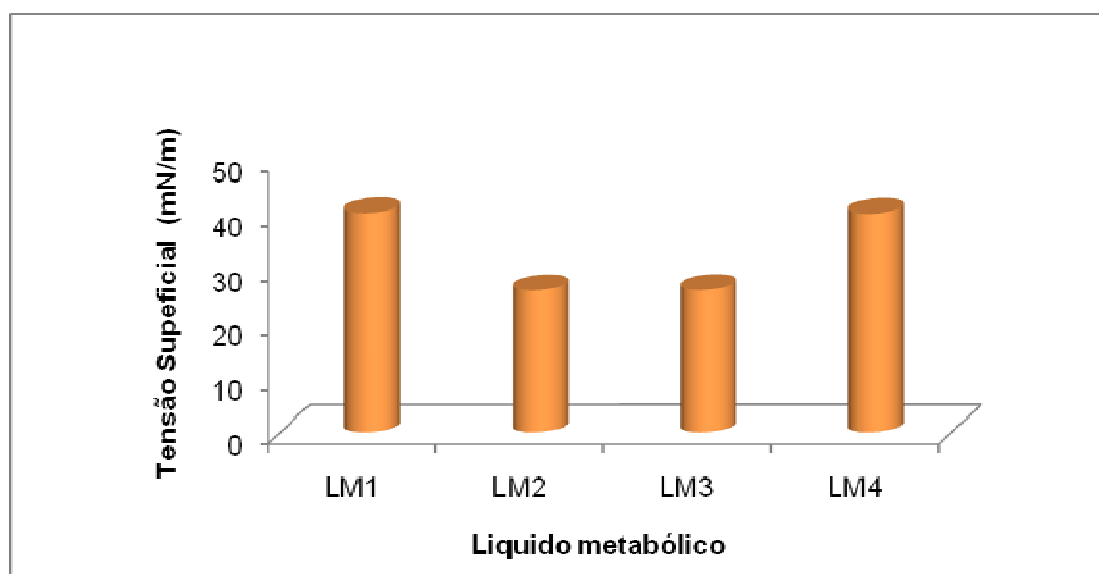


Figura 3- Comprovação da produção extracelular do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 avaliado pela tensão superficial do líquido metabólico, da condição selecionada do planejamento. LM1 (controle), LM2 (líquido metabólico com células de *C. violaceum*), LM3 (líquido metabólico livre de células) e LM4 (líquido metabólico após extração do biossurfactante).

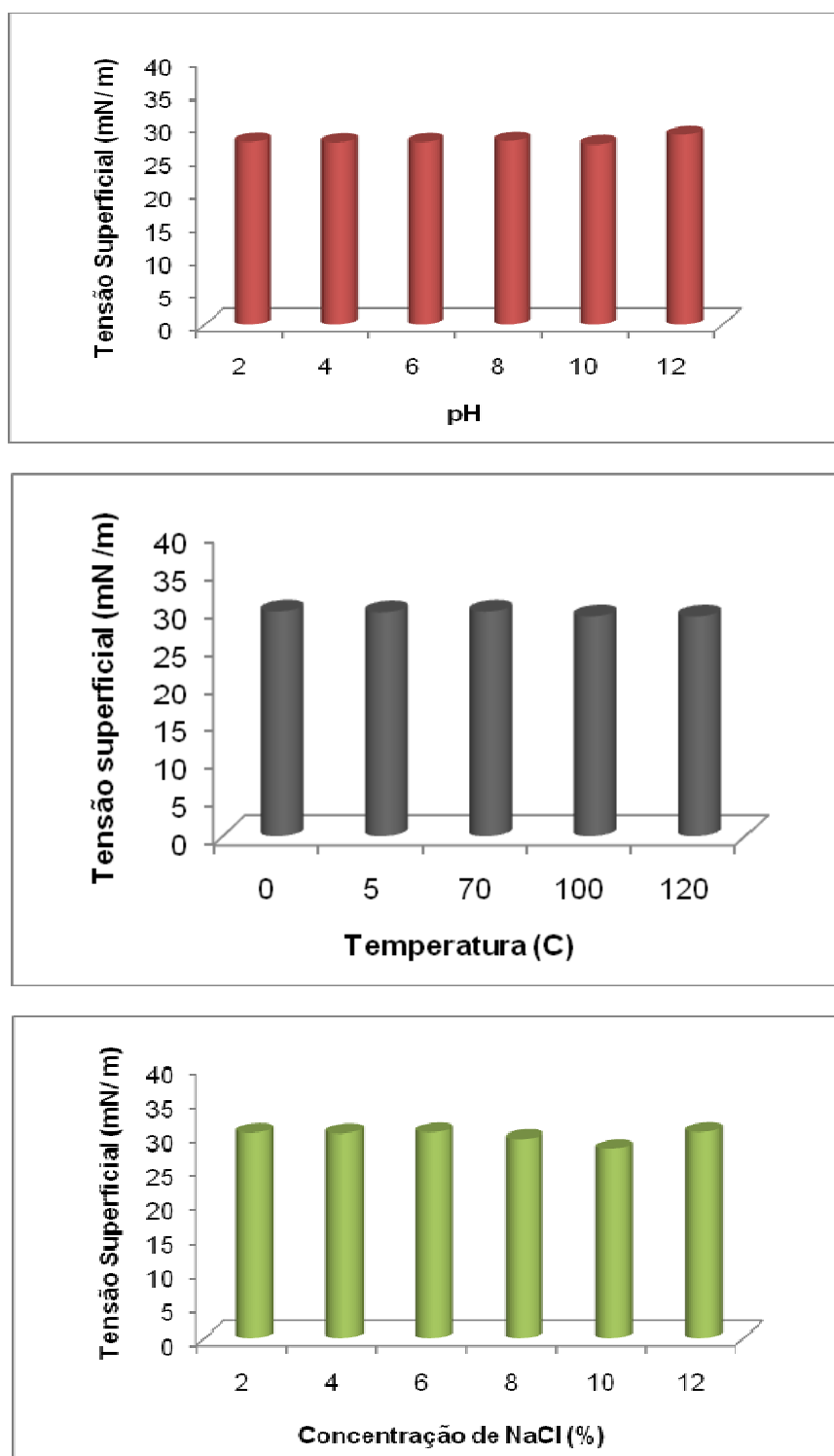


Figura 4 - Estabilidade do biossurfactante determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463. (A) diferentes valores de pH; (B) diferentes temperaturas (C) diferentes concentrações de NaCl

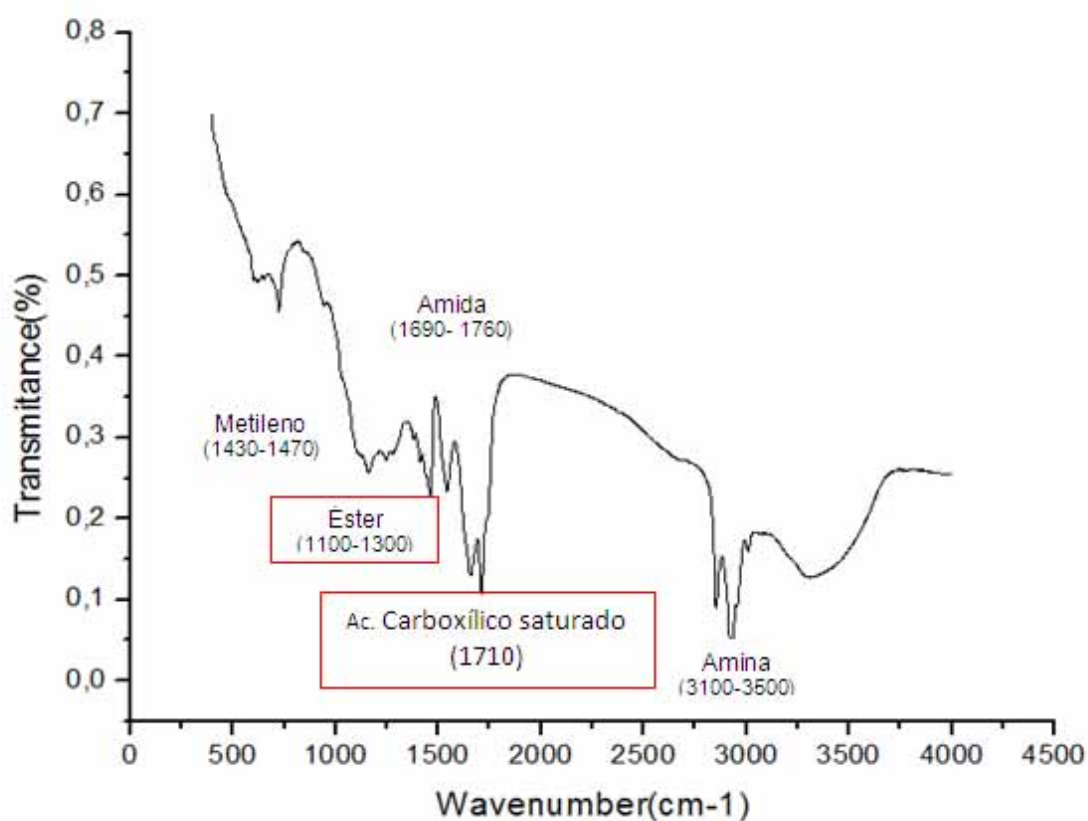


Figura 5 - Espectrometria ao raio infravermelho (IV) do biossurfactante extraído de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 através da precipitação com sulfato de amônio pré-purificado pela diálise.

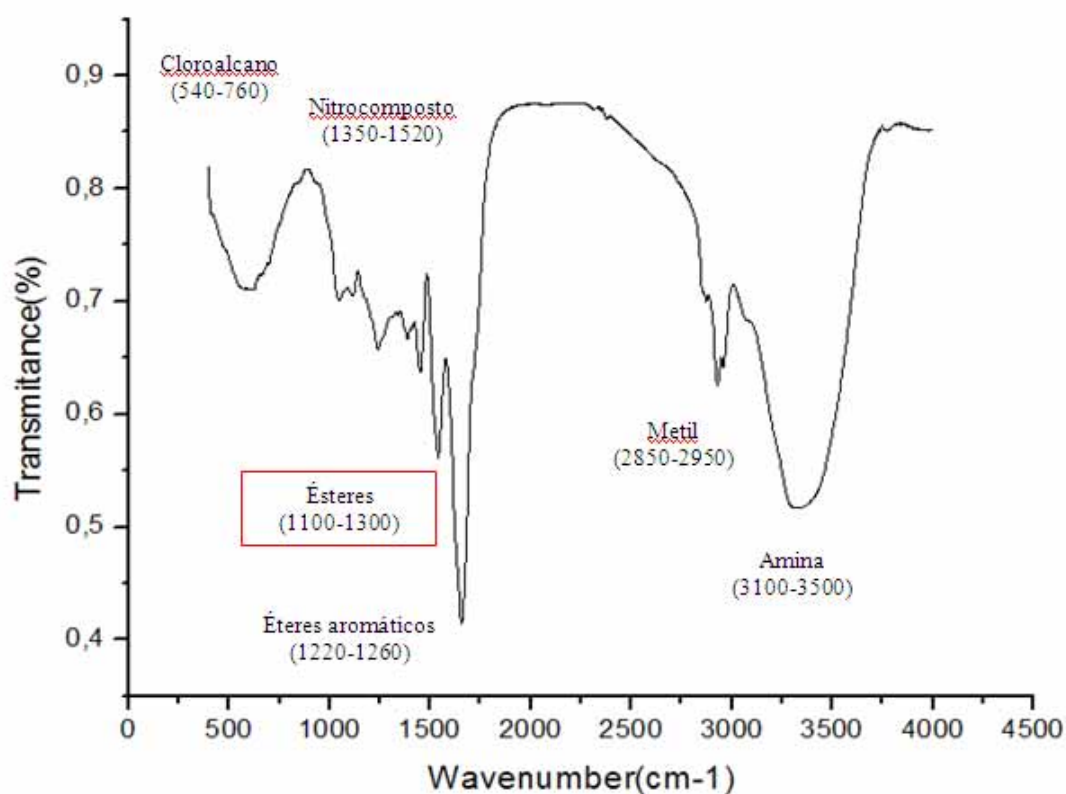


Figura 6 - Espectrometria ao raio infravermelho (IV) do biossurfactante extraído de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 através da acidificação do líquido metabólico livre de células, com ácido clorídrico pré-purificado com clorofórmio-metanol.

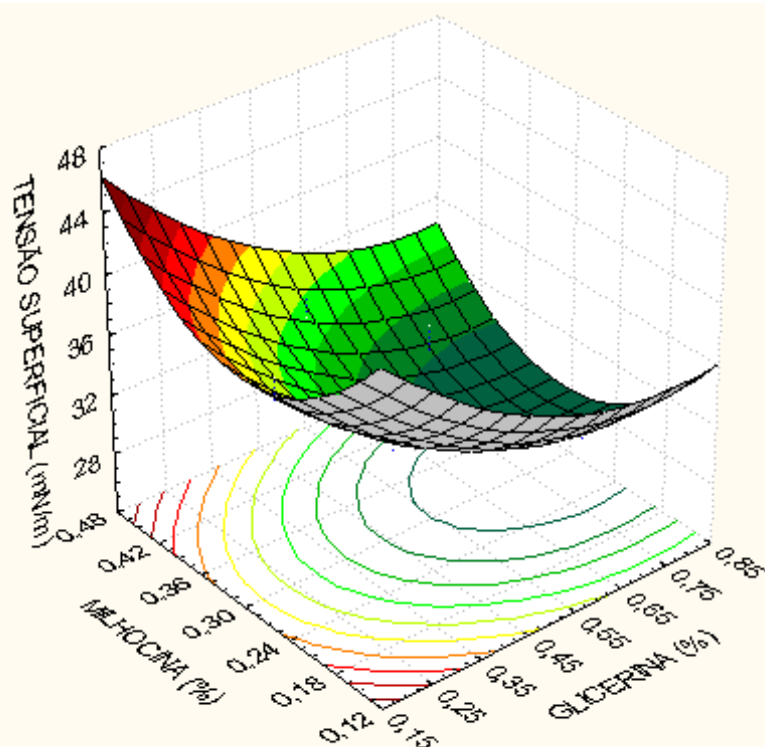


Figura 7- Superfície de resposta na produção de biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 formulado por diferentes concentrações de melhocina e glicerina determinado pela tensão superficial.

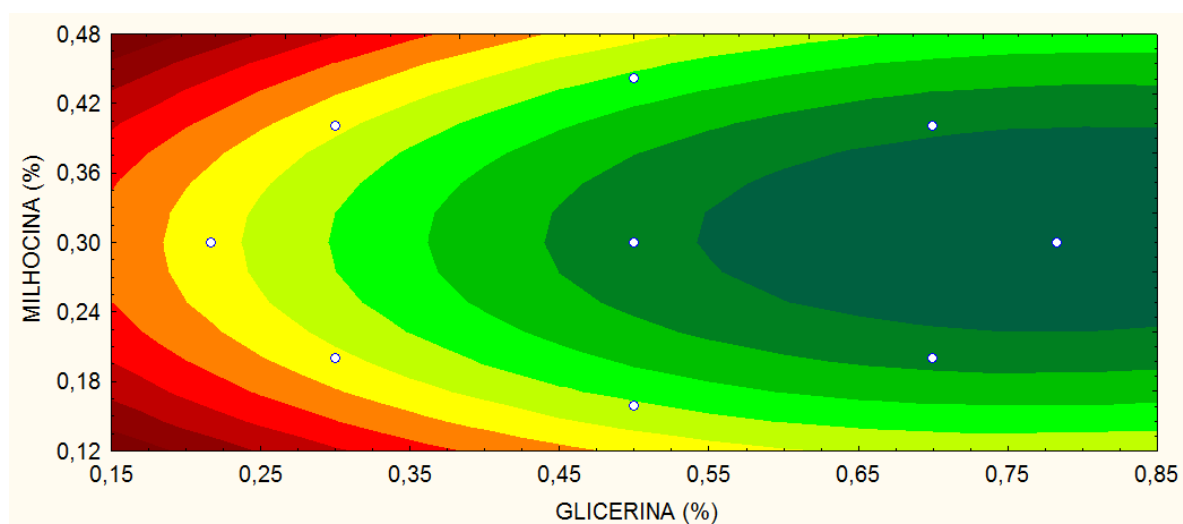


Figura 8 – Curvas de contorno na produção de biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 formulado por diferentes concentrações de milhocina e glicerina determinado pela tensão superficial.

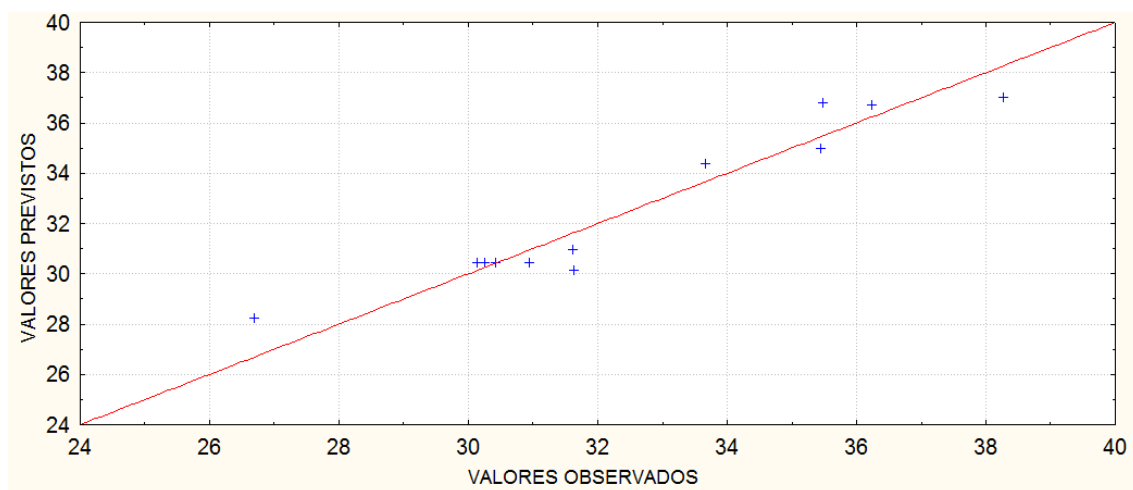


Figura 9 - Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 com 72 horas de cultivo.

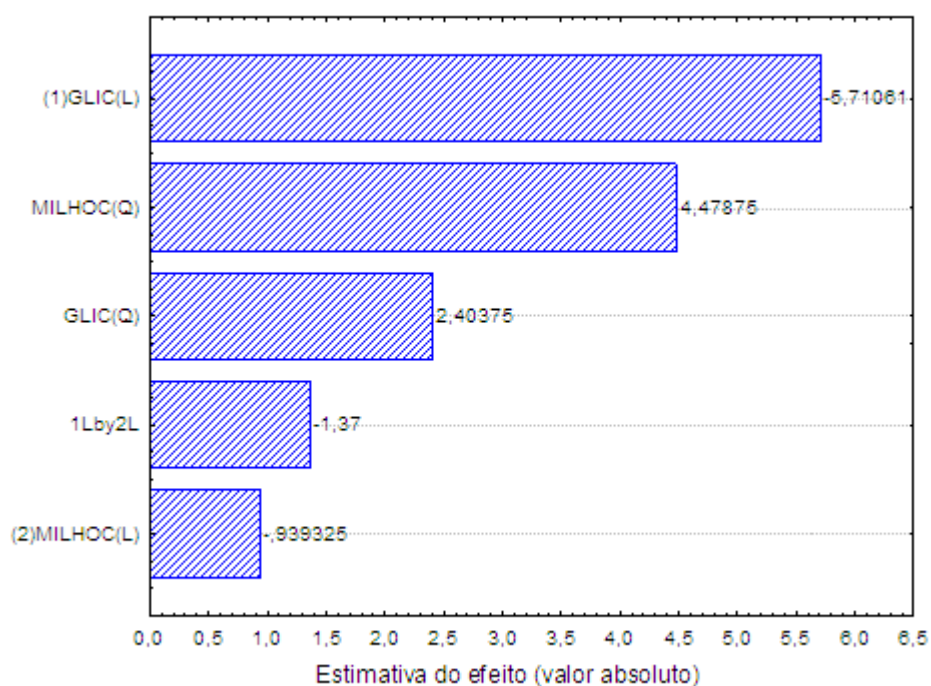


Figura 10 – Efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 com 72 horas de cultivo.

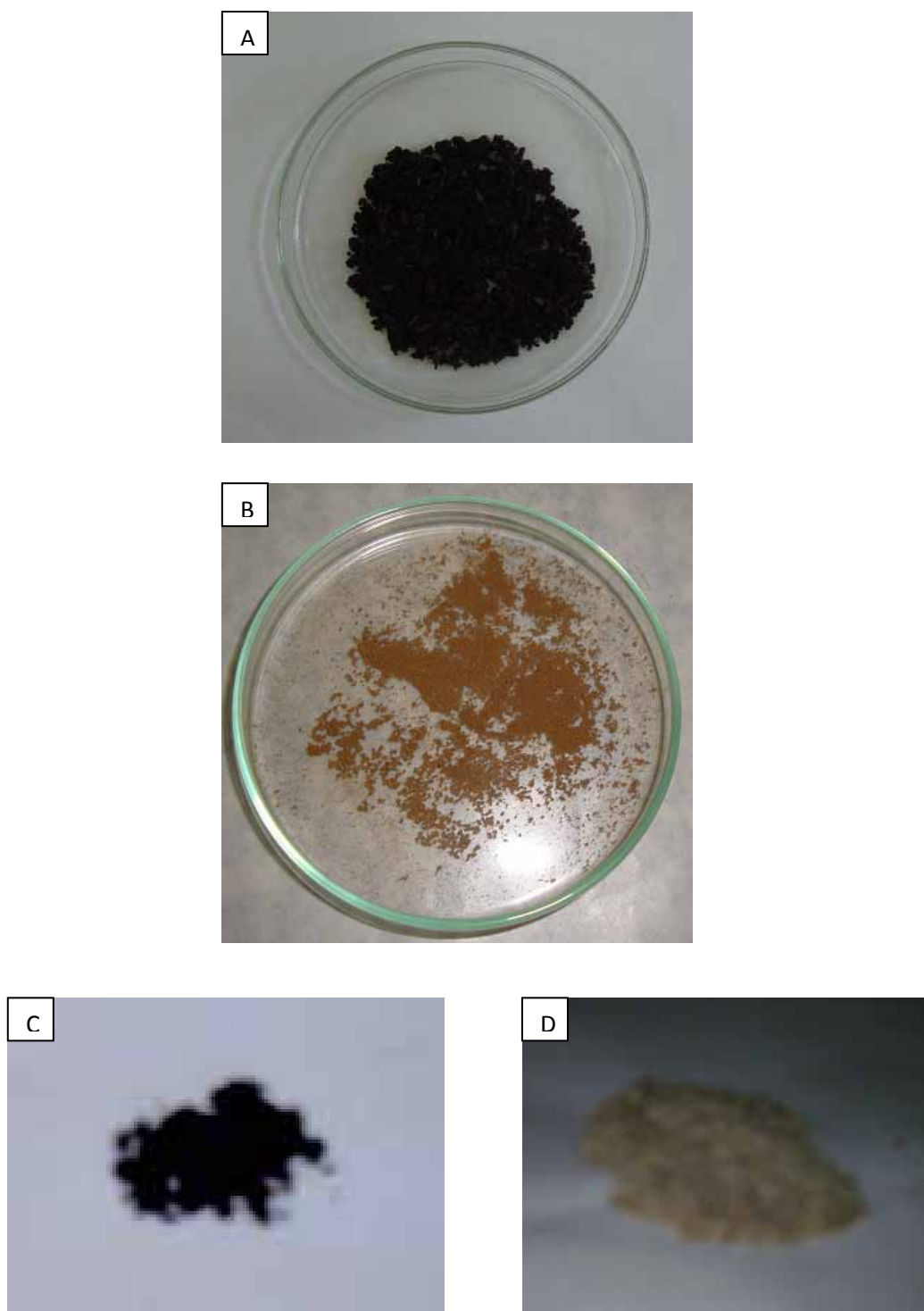


Figura 11 – Isolamento e pré-purificação do biossurfactante produzido por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463. A – biossurfactante bruto isolado por acidificação; B – biossurfactante pré-purificado com a utilização de solvente (clorofórmio-metanol); C – biossurfactante bruto isolado por precipitação com sulfato de amônio; D – biossurfactante pré-purificado através da diálise.

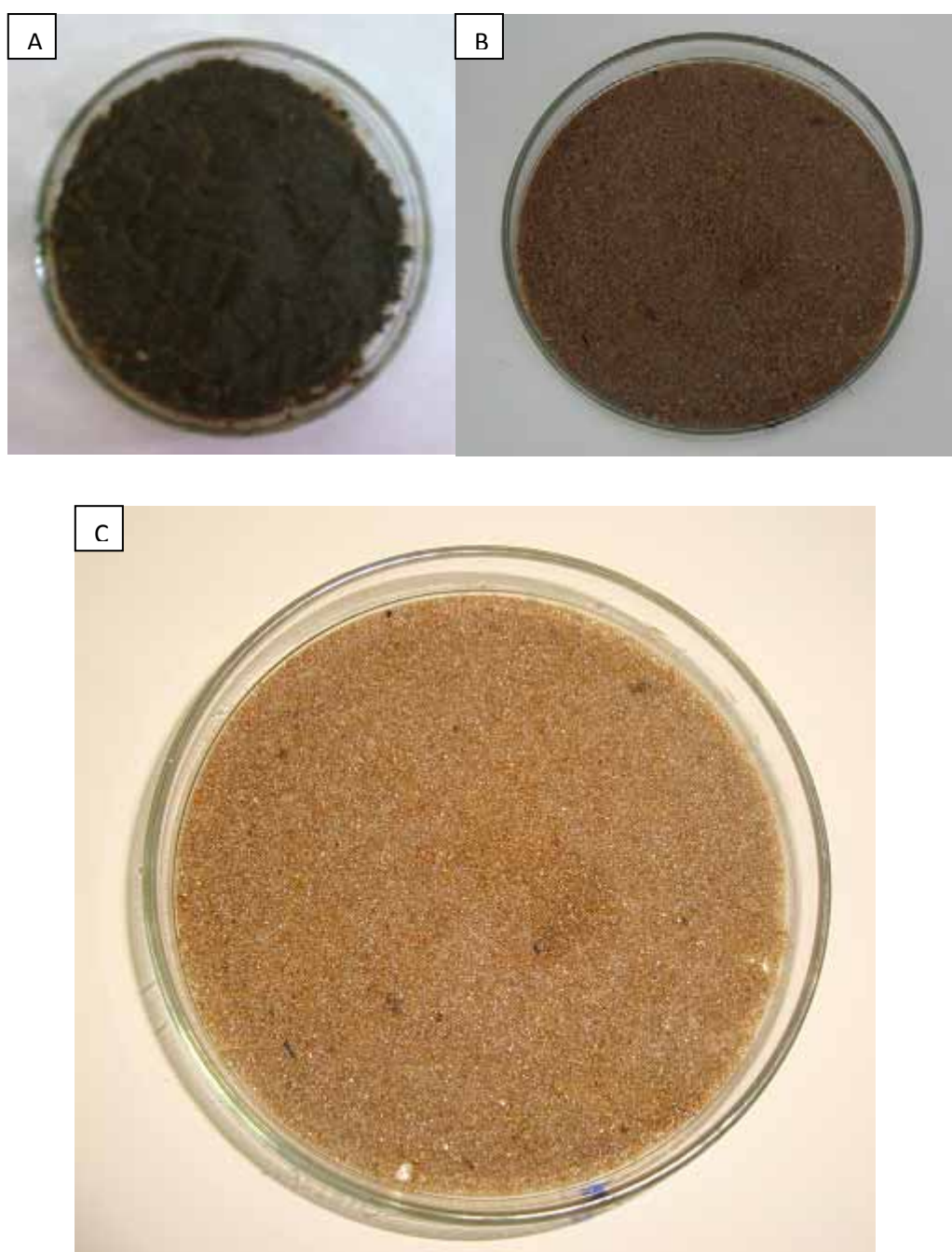


Figura 12 – Aplicação do biossurfactante em solo arenoso adsorvido com óleo queimado de motor por *Chromobacterium violaceum* UCP 1463. A – solo arenoso adsorvido com óleo queimado de motor; B – remoção do óleo queimado de motor com água destilada; C – remoção do óleo queimado de motor com o líquido metabólico, após 48 horas de cultivo.

Tabela 1 – Níveis e fatores do DCCR aplicado

Fator	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Glicerina (%)	0,218	0,3	0,5	0,7	0,782
Milhocina (%)	0,159	0,2	0,3	0,4	0,441

Tabela 2 - Matriz de planejamento e variáveis respostas para o DCCR aplicado do planejamento fatorial de 2^2

Condições	Glicerina	Milhocina
1	-	-
2	-	+
3	+	-
4	+	+
5	- 1,41	0
6	+ 1,41	0
7	0	+1,41
8	0	-1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Tabela 3 – Resultado do processo fermentativo de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 utilizando planejamento experimental (DCCR) de 2^2 com 4 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo, tendo como variável resposta a tensão superficial e a atividade de emulsificação.

Condições	Tensão Superficial (mN/m)	Atividade de emulsificação Óleo de soja (UAE/mL)
1	35,49	2,82
2	36,24	2,96
3	31,63	4,82
4	31,63	6,00
5	38,27	5,76
6	26,70	6,00
7	33,67	5,92
8	35,45	5,62
9	30,14	5,64
10	30,26	5,96
11	30,42	5,16
12	30,95	5,78

Tabela 4 – Resultado do processo fermentativo de *Chromobacterium violaceum* UCP 1463 utilizando planejamento experimental (DCCR) de 2^2 com 4 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo, tendo como variável resposta o índice de emulsificação utilizando diferentes substratos hidrofóbicos.

Condições	Óleo milho (%)	Óleo queimado de motor (%)	Óleo de soja (%)	Óleo canola (%)
1	43,47	75,00	23,80	15,00
2	43,47	85,71	16,66	45,45
3	10,00	71,42	13,63	22,72
4	21,73	90,00	22,72	26,08
5	25,00	80,00	36,36	15,00
6	43,47	85,71	27,27	50,00
7	13,60	87,50	20,00	15,00
8	20,00	62,50	15,00	20,00
9	42,39	100,00	78,66	21,57
10	43,47	97,50	76,27	20,66
11	40,00	98,00	80,00	22,22
12	43,00	97,00	75,78	20,18

Tabela 5 – Análise de variância dos dados experimentais para a tensão superficial.

Efeito	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado/F tabelado	p
(x1) Glicerina (L)	77,1434	1	77,14342	604,4538	0,000148
Glicerina (Q)	7,4218	1	7,42182	58,1534	0,004681
(x2) Milhocina (L)	0,3860	1	0,38601	3,0246	0,180394
Milhocina (Q)	28,6117	1	28,61172	224,1859	0,000647
1L x 2L	0,1369	1	0,13690	1,0727	0,376502
Erro puro	0,3829	3	0,12762		
Total	118,7206	11			

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados foram obtidos através da caracterização bioquímica (UCP 1552) e pela investigação da produção de biossurfactante com diferentes linhagens de *Chromobacterium violaceum*, (UCP 1467, UCP 1489, UCP 1552, ATCC 12472 e UCP 1463), conclui-se:

ARTIGO I

- Os resultados indicam que *C. violaceum* UCP 1467 e UCP 1489 possuem habilidade na produção de biossurfactante, indicando futuras aplicações na área de biorremediação;
- O biossurfactante produzido por *C. violaceum* UCP 1467 e UCP 1489 apresenta alta capacidade emulsificante, demonstrando ser um bom surfactante com propriedades emulsificantes, podendo ser utilizado em um vasto campo industrial.

ARTIGO II

- Pelos resultados obtidos foi identificada uma nova linhagem de *C. violaceum* UCP 1552 sendo confirmada através de testes bioquímicos e de susceptibilidade aos antimicrobianos, com resistência apenas para ampicilina, ampicilina-sulbactam e cefalotina;
- *C. violaceum* UCP 1552 apresenta habilidade em crescer em meio triptona, milhocina e óleo de milho pós-fritura como substratos alternativos e de baixo custo;
- O óleo de milho pós-fritura é o substrato que mais influencia na produção de biossurfactante e consequente redução da tensão superficial, segundo o diagrama de Pareto;

- O biossurfactante produzido por *C. violaceum* UCP 1552 demonstra resultados promissores para biorremediação, considerando a redução da tensão superficial e capacidade de emulsificação no meio utilizado.

ARTIGO III

- *C. violaceum* ATCC 12472 apresenta habilidade em crescer em meio com milhocina, lactose e óleo de milho como substratos;
- O biossurfactante produzido por *C. violaceum* ATCC 12472 demonstra valores reduzidos de tensão superficial com significativas propriedades emulsificantes;
- A variável independente milhocina é a que mais influencia na produção de biossurfactante e consequente redução da tensão superficial;
- O biossurfactante produzido por *C. violaceum* indica resultados promissores para sua aplicação no processo de biorremediação.

ARTIGO IV

- ⇒ A linhagem de *C. violaceum* UCP 1463 isolada em amostra de solo da região Amazônica, apresenta elevado potencial na produção de biossurfactante;
- ⇒ O novo meio de produção de biossurfactante constituído por glicerina e milhocina, possui adequado balanço dos nutrientes, formando provavelmente, uma relação ideal entre as fontes de carbono e nitrogênio;
- ⇒ O biossurfactante produzido por *C. violaceum*, propicia a formação e estabilização das emulsões indicando sua propriedade emulsificante;

- ⇒ O biossurfactante produzido por *C. violaceum* é caracterizado como complexo polimérico devido à presença de carboidratos, lipídeos e proteínas;
- ⇒ Em meio formulado com glicerina e milhocina *C. violaceum* UCP 1463 produz um biossurfactante extracelular do tipo aniônico;
- ⇒ Através da espectrometria ao raio infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FT-IR), constata-se a presença de menos impurezas do biossurfactante isolado com precipitação e posterior diálise da amostra, observando a presença do radical carbonila composto pelas ligações éster e ácido carboxílico;
- ⇒ A precipitação e a diálise é o melhor método para purificar o biossurfactante produzido por *C. violaceum* UCP 1463;
- ⇒ O biossurfactante de *C. violaceum* demonstra efetiva estabilidade em todos os pH's e em todas as temperaturas testadas. No entanto, apresentou estabilidade ao NaCl somente nas concentrações de 8% e 10%;
- ⇒ O planejamento experimental do tipo DCCR apresentou-se como uma ferramenta muito útil e aplicável para determinar o comportamento das variáveis independentes glicerina e milhocina sobre a variável resposta tensão superficial;
- ⇒ O modelo obtido pode ser utilizado para previsão do fenômeno na faixa de valores das variáveis independentes utilizadas;
- ⇒ O biossurfactante produzido por *C. violaceum* apresenta potencial de aplicação em processos de biorremediação devido à eficiência na remoção do óleo queimado de motor em solo arenoso.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Online submission of manuscript

Microsoft Word or PDF formats may be submitted online to Science Publications for initial evaluation. For online submission of manuscripts authors should go to ["Online Submission"](#)

AUTHOR MATERIAL ARCHIVE POLICY

Author(s) who require the return of any submitted material that is accepted for publication should inform the Editorial Office after acceptance. If no indication is given that author material should be returned, Science Publications will dispose of all hard copy and electronic material two months after publication.

STYLE OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be written in clear, concise and grammatically correct English (with 10 font size and Times New Roman font style) so that they are intelligible to the professional reader who is not a specialist in any particular field. Manuscripts that do not conform to these requirements and the following manuscript format may be returned to the author prior to review for correction. The entire manuscript, including references, should be typed single spaced on one side of the paper, with margins of 1 inch each side. All pages should be numbered consecutively in the bottom centre. Indent new paragraphs. Turn the hyphenation option off, including only those hyphens that are essential to the meaning. The manuscript should be presented in the following order.

Title page

This should contain the title (capitalize first letter of each word in the title) of the contribution and the name(s) and address(es) of the author(s). The full postal address, Internet e-mail address, telephone and facsimile numbers of the author who will receive correspondence and check the proofs should be included, as well as the present address of any author if different from that where the work was carried out. The main title should, where possible, contain the major key words used in the body of the manuscript; the title should contain the scientific name and authorities of the insect with the order and family placed in parentheses.

Abstract

All manuscripts must include a brief but informative Abstract intelligible without reference to the main text. It should not exceed 300 words and should describe the scope, hypothesis or rationale for the work and the main findings. Both common and scientific names should be included; the authorities are not given if they appear in the title. References to the literature and mathematical symbols / equations should not be included. Abstract must include following sections:

Problem Statement: This section should include answers of the questions:

- Why was research needed?.
- What was the context of the work?.
- Introduce the problem or provide background for what you will address.

Approach:

- What did you do and how did you go about solving or making progress on the problem.
- Describe the method of research, study, or analysis applied to the problem.

Results:

- What results did you get?
- State what you found and relate it to the problem.
- Summarize the major results in numbers, avoid vague, hand waving results such as “very small” or “significant”.

Conclusions/Recommendations:

- What are the implications of your answer?
- State the relevance, implications, or significance of the results or conclusions, to the business.
- Significance of work is often implied by the recommendations or implications for future work.

Keywords

Key words (3-5) should be provided below the Abstract to assist with indexing of the article. These should not duplicate key words from the title.

Introduction

This section should include sufficient background information to set the work in context. The aims of the manuscript should be clearly stated. The introduction should not contain either findings or conclusions.

Materials and Methods

This should be concise but provide sufficient detail to allow the work to be repeated by others.

Results

Results should be presented in a logical sequence in the text, tables and figures; repetitive presentation of the same data in different forms should be avoided. The results should not contain material appropriate to the Discussion.

Discussion

This should consider the results in relation to any hypotheses advanced in the Introduction and place the study in the context of other work. Only in exceptional cases should the Results and Discussion sections be combined.

Acknowledgment

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. Authors must declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest in a covering letter submitted with

the manuscript. Financial and technical assistance may be acknowledged here. Anonymous reviewers should not be acknowledged. It is the authors' responsibility to obtain written permission to quote material that has appeared in another publication.

References

Bibliographic references in the text appear like [1, 2, 5, 6], using square brace in superscript. References should be numbered consecutively, with style:

Journal paper:

1. Hadjibabaie, M., N. Rastkari, A.Rezaie and M. Abdollahi, 2005. The Adverse Drug Reaction in the Gastrointestinal Tract: An Overview. *Intl. J. Pharmacol.*, 1 (1): 1-8.

Books:

1. Daniel A. Potter, 2002. Destructive turfgrass insects: Biology, diagnosis and control. Wiley Canada Publishers, pp: 24-67

Chapters in Book:

1. Bray R.A., 1994. The leucaena psyllid. In: Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture (eds R.C. Gutteridge and H.M. Shelton) pp. 283–291. CAB International, Oxford.

Titles of journals should be given in full. 'In press' can only be used to cite manuscripts actually accepted for publication in a journal. Citations such as 'manuscript in preparation' or 'manuscript submitted' are not permitted. Data from such manuscripts can only be mentioned in the text as 'unpublished data'.

Authors must provide Digital Object Identifier (DOI) number for all references, just in case, if there is no DOI for any reference, author may provide its URL / direct accessible web link for verification purpose. All other references i.e. without DOI or internet link are not acceptable.

TABLES

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals. Each table should be presented on a separate page with a comprehensive but concise legend above the table. Tables should be double-spaced and vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations should be defined in footnotes. Use superscript letters (not numbers) for footnotes and keep footnotes to a minimum. *, **, *** should be reserved for P values. The table and its legend/footnotes should be understandable without reference to the text.

FIGURES

Only scientifically necessary illustrations should be included. All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Each figure should be labeled on the back in very soft marker or chinagraph pencil, indicating name of author(s), figure number and orientation. (Do not use an adhesive label.) Figures should be sized to fit within the column (82 mm) or the full text width (171 mm). Line figures should be supplied as sharp, black and white graphs or diagrams, drawn professionally or with a computer graphics package; lettering should be included. Photographs should be supplied as sharp, glossy, black and white photographic prints and must be unmounted. Individual photographs forming a composite figure should be of equal contrast, to facilitate printing and should be accurately squared. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration. Graphics should be supplied as high resolution (at least 300 d.p.i.) electronic files, saved as .eps or .tif format. A high resolution print-out

must also be provided. Digital images supplied only as low-resolution print-outs cannot be used.

COLOUR FIGURES

Colour photographs should be submitted as good quality, glossy colour prints. Authors have to bear the cost of colour printing.

FIGURE LEGENDS

Legends should be self-explanatory and typed on a separate sheet. The legend should incorporate definitions of any symbols used and all abbreviations and units of measurement should be explained so that the figure and its legend is understandable without reference to the text. (Provide a letter stating copyright authorization if figures have been reproduced from another source.)

ABBREVIATION AND UNITS

SI units (metre, kilogram etc.), as outlined in the latest edition of Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors (Royal Society of Medicine Press, London), should be used wherever possible. Statistics and measurements should always be given in figures; that is, 10 mm, except where the number begins the sentence. When the number does not refer to a unit measurement, it is spelt out, except where the number is greater than nine. Use only standard abbreviations. The word 'Figure' should be shortened to Fig. unless starting a sentence.

SCIENTIFIC NAMES

The complete scientific name (genus, species and authority) and cultivar or strain where appropriate, should be given for all animals when first mentioned; authorities are not needed for plants. The generic name may be abbreviated to an initial in subsequent references except at the start of sentences and where intervening references to other genera would cause confusion.

PROOFS

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (Portable Document Format) file and should be returned within 3 days of receipt. Alterations to the text and figures (other than the essential correction of errors) are unacceptable at proof stage and authors may be charged for excessive alterations. Acrobat Reader will be required in order to read the PDF. This software can be downloaded from the following website: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Authors should therefore supply an e-mail address to which proofs can be e-mailed. If absent, authors should arrange for a colleague to access their e-mail, retrieve the PDF proof and check and return it to the publisher on their behalf.

PAGE CHARGES

There are nominal page / processing charges of US\$ 75 per 8.5 X 11 inches finally type set page. Authors would be advised about the total page charges as soon as we receive article. Prompt submission of completed and duly signed page charges form is required from authors and institution before publishing of article.

CHECK LIST

We recommend that you ask a colleague to read over your paper prior to submission to ensure it is of a high standard and conforms to a high level of scientific writing.

Before submission of your manuscript, please check that:

- All references cited in the text are included in the reference section.
- All figures and tables are cited in the text.
- Figures are at least 300 d.p.i.
- The pages are numbered.

SAMPLE COVERING LETTER

The Executive Managing Editor
American Journal of Applied Sciences
Science Publications New York, USA

Subject: **Submission of manuscript**

Dear Sir

I/We would like to submit the following manuscript for possible evaluation

Manuscript Title

Name and address of corresponding author

Telephone #

Fax #

E-mail:

I (we) affirm that the manuscript has been prepared in accordance with Science Publication's journals Instructions for Contributors.

I (we) have read the manuscript and I (we) hereby affirm that the content of this manuscript or a major portion thereof has not been published in a refereed journal, and it is not being submitted for publication elsewhere.

Type of Manuscript (check one):

- ☐ Full length paper
- ☐ Review Article
- ☐ Mini-Review
- ☐ Short Communication
- ☐ Research Note
- ☐ Symposium paper (Name of Symposium)

Signature of Corresponding Author

Science Publications All Rights Reserved.

World Journal of Microbiology and Biotechnology

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.

- Use the automatic page numbering function to number the pages.
 - Do not use field functions.
 - Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
 - Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
 - Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php
- For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- EndNote style

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

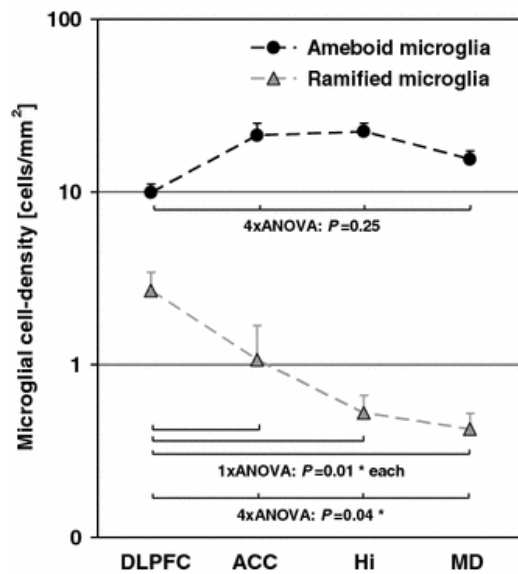
ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

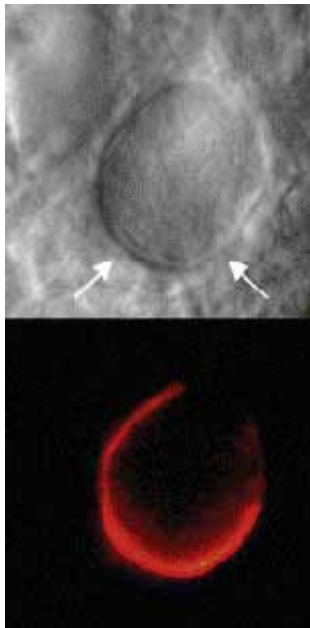
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
-

Line Art



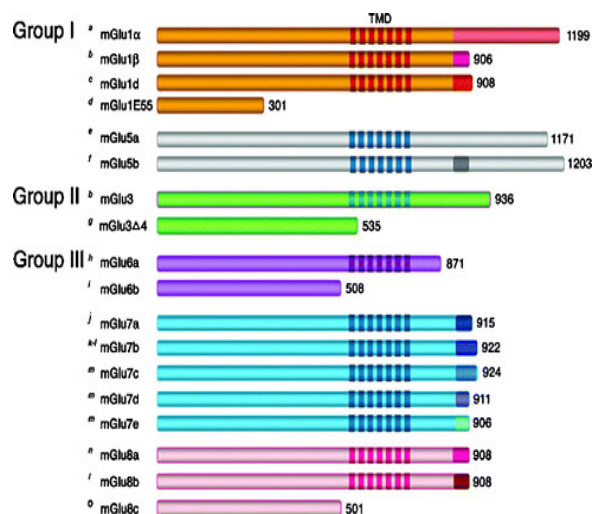
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing,

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL STANDARDS

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

CONFLICT OF INTEREST

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

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 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. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

2010 INSTRUCTIONS TO AUTHORS*

SCOPE

Applied and Environmental Microbiology (AEM) publishes descriptions of all aspects of applied microbial research, basic research on microbial ecology, and research of a genetic and molecular nature that focuses on microbial topics of practical value. Research must address salient microbiological principles, fundamental microbial processes, or basic questions in applied or environmental microbiology. Topics that are considered include microbiology in relation to foods, agriculture, industry, biotechnology, public health, plants, and invertebrates and basic biological properties of bacteria, fungi, algae, protozoa, and other simple eukaryotic organisms as related to microbial ecology. Manuscripts should report new and significant findings that advance the understanding of microbiology and upon which other scientists may build. To best serve its readership, the journal must accept only those papers that are most significant to the field of applied and environmental microbiology. Thus, the editors will reject manuscripts that, while scientifically sound, represent only incremental extensions of other studies, are mainly confirmatory, or do not pursue a question in sufficient depth.

The **biodegradation** section describes novel microbial processes for alteration, removal, or utilization of environmental or anthropogenic chemicals.

Papers in the **biotechnology** section describe the use and modification of organisms in order to achieve socially beneficial objectives.

The **environmental microbiology** section covers manuscripts that focus on research related to microorganisms in the environment. This is distinct from the microbial ecology section, which focuses on ecological relationships, such as interactions among organisms, their structure and functional role in an ecosystem, and community level studies. Thus, the environmental microbiology section features articles that focus on specific organisms in the environment, rather than a whole community, as well as those in which the study is not focused on implied or stated underlying ecological relationships.

The **enzymology and protein engineering** section covers the structure and function of environmentally or industrially significant proteins and how they can be modified to achieve practical catalytic objectives.

Included in the **evolutionary and genomic microbiology** section are papers detailing newly described evolutionary processes and evolutionary relationships among microorganisms. Topics include genomic analysis of established microorganisms and metagenomic investigation of microbial populations in the environment.

The **food microbiology** section covers manuscripts dealing with all aspects of food microbiology, including microbial food safety, microbial ecology of foods, predictive food microbiology, probiotics, food fermentations, and food spoilage.

The **genetics and molecular biology** section includes papers describing genetic organization, expression, mutation, and repair in organisms with environmental or practical significance.

Manuscripts for the **geomicrobiology** section must emphasize the role of microorganisms in geobiochemical processes in terrestrial or aquatic ecosystems, including subsurface, aquifer, and oceanic environments. Topics include mineralization, the use of inorganic ions in energy metabolism, and growth in extreme environments. Manuscripts focused on geological processes with only marginal links to microbiology will not qualify for AEM.

Invertebrate microbiology manuscripts should address interactions between invertebrates and microorganisms, ranging from commensalism and mutualism to parasitism and pathogenicity. Manuscripts describing work dealing with the metabolites or toxins from animal, plant, or insect cells or the physiology of such cells are not suitable for AEM unless the work concerns a microbial community or individual microorganisms.

New microbiological **methods** must provide novel avenues to address fundamental biological questions and will be considered for publication in AEM when accompanied by a demonstrated application. Descriptions of the application of previously described technologies, including the cloning, amplification, and expression of "foreign" genes, to a new genus or species of microbe will

generally not be considered for independent publication. Manuscripts that describe the construction of engineered strains for innovative process application, development, or enhancement must present results to authenticate the utility, superiority, and uniqueness of such strains.

The **microbial ecology** section covers a wide range of topics on the ecology of microorganisms, including culture-independent molecular assessments that provide new insights into (i) the structure-function relationships of microorganisms, (ii) the impact of in situ conditions on community structure, or (iii) the effect of changes in microbial community composition on ecosystem function. Archival phylogenetic snapshots that do not provide such insights are not acceptable for publication in AEM.

Manuscripts submitted to the **mycology** section should be clearly of a microbiological nature and may deal with basic biology, biochemistry, genetics, or physiology of fungi, molds, yeasts, or algae. Papers dealing purely with taxonomy or phylogeny, with fungal or algal structure, or with metabolism/alteration of metabolites/toxins by animal, plant, or insect cells, tissues, or organisms are not suitable. Documentation of the distribution/occurrence of toxins or metabolites in natural samples (foods, cereals, grains, and soils, etc.) is suitable if the work includes studies involving the isolation, occurrence, or enumeration of the responsible microbes in these samples. The chemical or biochemical elucidation of metabolite or toxin structures is suitable if the work includes aspects of the enzymology or biosynthesis of these compounds.

The **physiology** section addresses questions about how organisms adapt to changes in their environment, including bioenergetics, stress, starvation, metabolic challenges, and responses to nutritional variation.

The **plant microbiology** section covers manuscripts dealing with all aspects of plant-microorganism interactions, including symbiotic and rhizosphere bacteria and phytopathogenic microorganisms.

The **public health microbiology** section focuses on manuscripts that describe the various aspects of the behavior of environmentally transmitted microorganisms that cause human disease. These include, but are not limited to, microorganisms transmitted through water, air, soil, and/or environmental surfaces.

ASM publishes a number of different journals covering various aspects of the field of microbiology. Each journal has a prescribed scope which must be considered in determining the most appropriate journal for each manuscript. The following guidelines may be of assistance.

(i) AEM will consider manuscripts describing properties of enzymes and proteins that are produced by either wild-type or genetically engineered microorganisms and that are significant or have potential significance in industrial or environmental settings. Studies dealing with basic biological phenomena of enzymes or proteins or in which enzymes have been used in investigations of basic biological functions are more appropriate for the *Journal of Bacteriology*.

(ii) AEM will consider papers which describe the use of antimicrobial agents as tools for elucidating aspects of applied and environmental microbiology. Other papers dealing with antimicrobial agents, including manuscripts dealing with the biosynthesis and metabolism of such agents, are more appropriate for *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

(iii) AEM will consider manuscripts that concern bacteriophages or other viruses in relation to the environment, public health, or industrial microbiology. Papers that primarily concern attachment and intracellular replication of viruses, virus interactions with host metabolism, virus structure, or virus genomics are more appropriate for the *Journal of Bacteriology* or the *Journal of Virology*.

(iv) Manuscripts dealing with the immune system or with topics of basic medical interest or oral microbiology are more appropriate for *Infection and Immunity*. Reports of clinical investigations and environmental biology applied to hospitals should be submitted to the *Journal of Clinical Microbiology*.

(v) AEM and *Eukaryotic Cell* (EC) accept manuscripts on population dynamics and the ecology of eukaryotic microbes. Studies of microbial communities and of microbial populations with identified economic or ecological significance, e.g., plant pathogens or symbionts, are usually more appropriate for AEM. Studies of single species of eukaryotes, especially "model" organisms or those without identified economic or ecological importance, are usually more appropriate for EC.

(vi) Manuscripts dealing with the purification and characterization of enzymes or cloning of genes that have already been extensively described for other organisms will be considered for publication only if they offer experimentally supported new insights into the biological role, properties, or applications of these enzymes. Descriptions of genes or enzymes that differ only in minor ways from the prototypes are not suitable for AEM.

Questions about these guidelines may be directed to the editor in chief of the journal being considered.

If transfer to another ASM journal is recommended by an editor, the corresponding author will be contacted.

Note that a manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals.

EDITORIAL POLICY

Use of Microbiological Information

The Council Policy Committee (CPC) of the American Society for Microbiology affirms the long-standing position of the Society that microbiologists will work for the proper and beneficent application of science and will call to the attention of the public or the appropriate authorities misuses of microbiology or of information derived from microbiology. ASM members are obligated to discourage any use of microbiology contrary to the welfare of humankind, including the use of microbes as biological weapons. Bioterrorism violates the fundamental principles expressed in the Code of Ethics of the Society and is abhorrent to ASM and its members.

ASM recognizes that there are valid concerns regarding the publication of information in scientific journals that could be put to inappropriate use as described in the CPC resolution mentioned above. Members of the ASM Publications Board will evaluate the rare manuscript that might raise such issues during the review process. However, as indicated elsewhere in these Instructions, research articles must contain sufficient detail, and material/information must be made available, to permit the work to be repeated by others. Supply of materials should be in accordance with laws and regulations governing the shipment, transfer, possession, and use of biological materials and must be for legitimate, bona fide research needs. Links to, and information regarding, these laws and regulations can be found at <http://www.asm.org/> under the Public Policy tab. We ask that authors pay particular attention to the NSAR Select Agent/Toxin list on the CDC website <http://www.selectagents.gov/index.html> and the NSABB criteria for identifying dual use research of concern in the report "Proposed Framework for the Oversight of Dual Use Life Sciences Research: Strategies for Minimizing the Potential Misuse of Research Information" on the Office of Biotechnology Activities website <http://oba.od.nih.gov/biosecurity/> (pages 17-22).

Ethical Guidelines

Authors are expected to adhere to the highest ethical standards. The following sections of these Instructions include detailed information about ASM's ethical standards. Failure to comply with the policies described in these Instructions may result in a letter of reprimand, a suspension of publishing privileges in ASM journals, and/or notification of the authors' institutions. Authors employed by companies whose policies do not permit them to comply with the ASM policies may be sanctioned as individuals and/or ASM may refuse to consider manuscripts having authors from such companies. The ASM Publications Board wishes to clarify the following in particular.

Plagiarism.

Misappropriating another person's intellectual property constitutes plagiarism. This includes copying sentences or paragraphs verbatim (or almost verbatim) from someone else's work, even if the original work is cited in the references. The NIH ORI publication "Avoiding Plagiarism, Self-Plagiarism, and Other Questionable Writing Practices: a Guide to Ethical Writing" (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/>) can help authors identify questionable writing practices.

Plagiarism is not limited to the text; it can involve any part of the manuscript, including figures and tables, in which material is copied from another publication without permission and attribution. An author may not reuse his or her own previously published work without attribution; this is considered self-plagiarism.

Primary publication.

Manuscripts submitted to the journal must represent reports of original research, and the original data must be available for review by the editor if necessary.

By submission of a manuscript to the journal, the authors guarantee that they have the authority to publish the work and that the manuscript, or one with substantially the same content, was not published previously, is not being considered or published elsewhere, and was not rejected on scientific grounds by another ASM journal. It is incumbent upon the author to acknowledge any prior publication, including his/her own articles, of the data contained in a manuscript submitted to an ASM journal. A copy of the relevant work should be submitted with the paper as supplemental material. Whether the material constitutes the substance of a paper and therefore renders the manuscript unacceptable for publication is an editorial decision.

In brief, a paper is not acceptable for submission to an ASM journal if it, or its substance, has been published/posted in:

- A serial, periodical, or book
- A conference report or symposium proceedings
- A technical bulletin or company white paper
- A nonpersonal website
- Any other retrievable source

The following do not preclude submission to, or publication by, an ASM journal, as long as the posted data do not constitute the substance of a submission:

- Posting of a method/protocol on a nonpersonal website
- Posting of a limited amount of original data on a personal/university/corporate website or websites of small collaborative groups working on a problem
- Posting of unpublished sequence data on the Internet (the URL where the sequence is posted should be included in the text)
- Preliminary disclosures of research findings as meeting posters, webcast as meeting presentations, or published in abstract form as adjuncts to a meeting, e.g., part of a program
- Posting of theses and dissertations on a personal/university-hosted website

Availability of materials.

By publishing in the journal, the authors agree that, subject to requirements or limitations imposed by laws or governmental regulations of the United States, any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Permissions.

The corresponding author is responsible for obtaining permission from both the original author and the original publisher (i.e., the copyright owner) to reproduce or modify figures (including maps) and tables and to reproduce text (in whole or in part) from previous publications.

Permission(s) must be obtained no later than the modification stage. The original signed permission(s) must be identified as to the relevant item in the ASM manuscript (e.g., "permissions for Fig. 1 in AEM00123-10") and submitted to the ASM production editor on request. In addition, a statement indicating that the material is being reprinted with permission must be included in the relevant figure legend or table footnote of the manuscript. Reprinted text must be enclosed in quotation marks, and the permission statement must be included as running text or indicated parenthetically.

It is expected that the authors will provide written assurance that permission to cite unpublished data or personal communications has been granted. For supplemental material intended for posting by ASM (see "Supplemental Material"), if the authors of the AEM manuscript are not also the owners of the supplemental material, the corresponding author must send to ASM signed permission from the copyright owner that allows posting of the material, as a supplement to the article, by ASM. The corresponding author is also responsible for incorporating in the supplemental material any copyright notices required by the owner.

Authorship.

All authors of a manuscript must have agreed to its submission and are responsible for its content (initial submission and any subsequent versions), including appropriate citations and acknowledgments, and must also have agreed that the corresponding author has the authority to act on their behalf in all matters pertaining to publication of the manuscript. The corresponding author is responsible for obtaining such agreements and for informing the coauthors of the manuscript's status throughout the submission, review, and publication process. Submitting a paper before all coauthors have read and approved it is considered an ethical violation, as is failure to credit someone who qualifies as a coauthor; however, ASM does not itself investigate or attempt to resolve authorship disputes.

An author is one who made a substantial contribution to the overall design and execution of the experiments; therefore, **ASM considers all authors responsible for the entire paper**. Individuals who provided assistance, e.g., supplied strains or reagents or critiqued the paper, need not be listed as authors but may be recognized in the Acknowledgments section.

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

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

All authors must agree to the order in which their names are listed in the byline. Statements regarding equal contributions by two or more authors (e.g., X.J. and Y.S. contributed equally to ...) are permitted as footnotes to bylines and must be agreed to by all of the authors. Other statements of attribution may be included in the Acknowledgments section.

A change in authorship (order of listing, addition or deletion of a name, or corresponding author designation) **after submission of the manuscript will be implemented only after receipt of signed statements of agreement from all parties involved.**

Disputes about authorship may delay or prevent review and/or publication of the manuscript. Should the individuals involved be unable to reach an accord, review and/or publication of the manuscript can proceed only after the matter is investigated and resolved by the authors' institution(s) and an official report of such and signed statements of agreement are provided to ASM.

Conflict of interest.

All authors are expected to disclose, in the manuscript submittal letter, any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. (Inclusion of a company name in the author address lines of the manuscript does not constitute disclosure.) Details of the disclosure to the editor will remain confidential. However, it is the responsibility of authors to provide, in the Acknowledgments section, a general statement disclosing financial or other relationships that are relevant to the study. Examples of potentially conflicting interests that should be disclosed include relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results and interests whose value would be enhanced by the results presented. All funding sources for the project, institutional and corporate, should be credited in the Acknowledgments section, as described below. In addition, if a manuscript concerns a commercial product, the manufacturer's name must be indicated in the Materials and Methods section or elsewhere in the text, as appropriate, in an obvious manner.

Copyright

To maintain and protect the Society's ownership and rights and to continue to afford scientists the opportunity to publish in high-quality journals, ASM requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all the authors on acceptance. Unless this agreement is executed (without changes and/or addenda), ASM will not publish the article.

In the copyright transfer agreement signed by an author, ASM grants to that author (and coauthors) the right to republish discrete portions of his/her (their) article in any other publication (print, CD-ROM, and other electronic forms) of which he/she is (they are) the author(s) or editor(s), on the condition that appropriate credit is given to the original ASM publication. This republication right also extends to posting on a host computer to which there is access via the Internet. Except as indicated below, significant portions of the article may not be reprinted/posted without ASM's prior written permission, however, as this would constitute duplicate publication.

Authors may post their own published articles on their personal or university-hosted (but not corporate, government, or similar) websites without ASM's prior written permission provided that appropriate credit is given (i.e., the copyright lines shown at the top of the first page).

The copyright transfer agreement asks that authors who were U.S. government employees and who wrote the article as part of their employment duties be identified. This is because works authored solely by such U.S. government employees are not subject to copyright protection, so there is no copyright to be transferred. The other provisions of the copyright transfer agreement, such as author representations of originality and authority to enter into the agreement, apply to U.S. government employee-authors as well as to other authors.

Copyright for supplemental material (see "Supplemental Material") remains with the author, but a license permitting the posting by ASM will be sent, along with the article copyright transfer agreement, to the corresponding author for signing at the acceptance stage. (If the author of the article is not also the copyright owner of the supplemental material, the corresponding author must send to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to the article, by ASM. The corresponding author is also responsible for incorporating into the supplemental material any copyright notices required by the owner.)

ASM also requires that copyright transfer agreements be signed for cover artwork/photographs.

Funding Agency Repositories

The National Institutes of Health (NIH) requests that its grantee and intramural authors provide copies of their accepted manuscripts to PubMed Central (PMC) for posting in the PMC Public Access Repository. However, AEM authors are automatically in compliance with this policy and need take no action themselves. For the past several years, ASM has deposited in PubMed

Central all publications from all ASM journals. Further, ASM policy is that all primary research articles are made available to everyone, free, 6 months after publication through PubMed Central, HighWire, and international PubMed Central-like repositories.

By having initiated these policies, ASM is in full compliance with NIH policy. For more information, see <http://publicaccess.nih.gov/>. ASM also allows AEM authors whose work was supported by similar funding agencies that have public access requirements like those of the NIH (e.g., the Wellcome Trust) to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by those funding agencies. If a funding agency does not itself maintain such a site, then ASM allows the author to fulfill that requirement by depositing the manuscript (not the typeset article) in an appropriate institutional or subject-based open repository established by a government or noncommercial entity.

Since ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication, ASM recommends that when submitting the accepted manuscript to PMC or a similar public access site, the author specify that the **posting release date for the manuscript be no earlier than 6 months after publication of the typeset article by ASM.**

Use of Human Subjects or Animals in Research

The use of human subjects or other animals for research purposes is regulated by the federal government and individual institutions. Manuscripts containing information related to human or animal use should clearly state that the research has complied with all relevant federal guidelines and institutional policies. Copies of these guidelines and policy statements must be available for review by the editor if necessary.

Nucleotide and Amino Acid Sequences

Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. The accession numbers should be included in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for short-form papers. If conclusions in a manuscript are based on the analysis of sequences and a GenBank/EMBL/DDBJ accession number is not provided at the time of the review, authors should provide the sequence data as supplemental material.

It is expected that, when previously published sequence accession numbers are cited in a manuscript, the original citations (e.g., journal articles) will be included in the References section when possible or reasonable.

Authors are also expected to do elementary searches and comparisons of nucleotide and amino acid sequences against the sequences in standard databases (e.g., GenBank) immediately before manuscripts are submitted and again at the proof stage.

Analyses should specify the database, and the date of each analysis should be indicated as, e.g., January 2010. If relevant, the version of the software used should be specified.

See "Presentation of Nucleic Acid Sequences" for nucleic acid sequence formatting instructions.

The URLs of the databases mentioned above are as follows: DNA Data Bank of Japan (DDBJ), <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>; EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), <http://www.ebi.ac.uk/embl/>; and National Center for Biotechnology Information (GenBank), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Proper Use of Locus Tags as Systematic Identifiers for Genes

To comply with recommendations from the International Nucleotide Sequence Database (INSD) Collaborators and to avoid conflicts in gene identification, researchers should implement the following two fundamental guidelines as standards for utilization of locus tags in genome analysis, annotation, submission, reporting, and publication. (i) Locus tag prefixes are systematic gene identifiers for all of the replicons of a genome and as such should be associated with a single genome project submission. (ii) New genome projects must be registered with INSD, and new locus tag prefixes must be assigned in cooperation with INSD to ensure that they conform to the agreed-upon criteria. Locus tag prefixes that are currently in use may be searched at the NCBI locus tag database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ltp.cgi>).

Structural Determinations

Coordinates for new structures of macromolecules determined by X-ray crystallography or cryo-electron microscopy must be deposited in the Protein Data Bank and assigned identification codes must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the coordinates will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send coordinates with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for short-form papers.

The URLs for coordinate deposition are <http://rcsb-deposit.rutgers.edu/> and <http://pdbdep.protein.osaka-u.ac.jp/top.html.en>.

Microarray Data

The entire set of supporting microarray data must be deposited in the appropriate public database (e.g., GEO, ArrayExpress, or CIBEX) and the assigned accession number(s) must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted

manuscript. Authors are encouraged to send the relevant data with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for short-form papers.

The URLs of the databases mentioned above are as follows: Gene Expression Omnibus (GEO), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>; ArrayExpress, <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>; and Center for Information Biology Gene Expression Database (CIBEX), <http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp>.

Culture Deposition

AEM expects authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. Since the authenticity of subcultures of culture collection specimens that are distributed by individuals cannot be ensured, authors should indicate laboratory strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

Mycobank

New scientific names of fungi along with key nomenclatural and descriptive material must be deposited in MycoBank (<http://www.Mycobank.org>) and the assigned accession number(s) must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send the relevant data with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for short-form papers.

Supplemental Material

Supplemental material intended for posting by ASM should be restricted primarily to large or complex data sets or results that cannot readily be displayed in printed form because of space or technical limitations. Such material may include data from microarray, structural, biochemical, or video imaging analyses. In such cases, the manuscript submitted for review should include a distillation of the results so that the principal conclusions are fully supported without referral to the supplemental material.

Supplemental material intended for posting by ASM must be uploaded as a separate Supplemental Material file(s) in Rapid Review and will be reviewed along with the manuscript. The maximum size permitted for an individual file is 25 MB. If your file exceeds this size, you must use a file compression utility (e.g., WinZip or Stuffit) to reduce the size below 25 MB. The decision to publish (i.e., post online only) the material with the article if it is accepted will be made by the editor. ASM will post no more than 10 individual supplemental files. It is possible that a manuscript will be accepted but that the supplemental material will not.

If the software required for users to view/use the supplemental material is not embedded in the file, ASM strongly urges you to use generally available/easily accessed programs or shareware if your data cannot be conveyed with the common applications.

Unlike the manuscript, supplemental material will not be edited by the ASM Journals staff and proofs will not be made available. References related to supplemental material only should not be listed in the References section of an article; instead, include them with the supplemental material hosted by ASM or posted on a personal/institutional website.

Supplemental material will always remain associated with its article and is not subject to any modifications after publication.

Material that has been published previously (print or online) is not acceptable for posting as supplemental material. Instead, the appropriate reference(s) to the original publication should be made in the manuscript text.

Copyright for the supplemental material remains with the author, but a license permitting the posting by ASM will be sent, along with the article copyright transfer agreement, to the corresponding author for signing. If you are not the copyright owner, you must provide to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to your article, by ASM. You are responsible for including in the supplemental material any copyright notices required by the owner.

See also "Publication Fees."

Warranties and Exclusions

Articles published in this journal represent the opinions of the authors and do not necessarily represent the opinions of ASM. ASM does not warrant the fitness or suitability, for any purpose, of any methodology, kit, product, or device described or identified in an article. The use of trade names is for identification purposes only and does not constitute endorsement by ASM.

SUBMISSION, REVIEW, AND PUBLICATION PROCESSES

Submission Process

All submissions to AEM must be made electronically via the Rapid Review online submission and peer review system at the following URL: <https://www.rapidreview.com/ASM2/CALogon.jsp>. E-mailed submissions are not accepted. First-time users must create an Author account, which may be used for submitting to all ASM journals.

Review Process

All manuscripts are considered to be confidential and are reviewed by the editors, members of the editorial board, or qualified ad hoc reviewers.

To expedite the review process, authors must recommend at least three reviewers who have expertise in the field, who are not members of their institution(s), who have not recently been associated with their laboratory(ies), and who could not otherwise be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. Please provide, where indicated on the submission form, contact information for suggested reviewers who are not editorial board members.

Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript should be included as supplemental material to facilitate the review.

When a manuscript is submitted to the journal, it is given a control number (e.g., AEM00047-10 version 1) and assigned to one of the editors. **(Always refer to this control number in communications with the editor and the Journals Department.)** It is the responsibility of the corresponding author to inform the coauthors of the manuscript's status throughout the submission, review, and publication processes. The reviewers operate under strict guidelines set forth in "Guidelines for Reviewers" (<http://www.journals.asm.org/misc/reviewguide.dtl>) and are expected to complete their reviews expeditiously.

The corresponding author is notified, generally within 4 to 6 weeks after submission, of the editor's decision to accept, reject, or require modification. When modification is requested, the corresponding author must either submit the modified version within 2 months or withdraw the manuscript. A point-by-point response to the reviews must be provided in the designated section of the submission form for the revised manuscript, and a compare copy of the manuscript (without figures) should be included as supplemental material if the editor requested one.

Manuscripts that have been rejected, or withdrawn after being returned for modification, may be resubmitted to the same ASM journal if the major criticisms have been addressed. A manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals; however, a manuscript rejected solely on the basis of scope may be "resubmitted" to a more appropriate ASM journal. **A manuscript is considered a resubmission no matter how much (or little) it differs from the rejected or withdrawn manuscript and regardless of how much time has passed.**

For all resubmissions (to the same or a different journal, irrespective of the extent of the revisions, and irrespective of the amount of time between rejection and resubmission), the cover letter must state that the manuscript is a resubmission, and the former manuscript control number must be provided in the appropriate field on the submission form. A point-by-point response to the review(s) and a compare copy of the revised manuscript showing all changes must be included as supplemental material (the Rebuttal section appears in the submission form only if the manuscript is a modification). Manuscripts resubmitted to the same journal are normally handled by the original editor.

Rejected manuscripts may be resubmitted only once unless permission has been obtained from the original editor or from the editor in chief.

Notification of Acceptance

When an editor has decided that a manuscript is acceptable for publication on the basis of scientific merit, the author and the Journals Department are notified. A PDF version of the accepted manuscript is posted online as soon as possible (see "AEM Accepts").

The text files undergo an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type, and the illustrations are examined. If all files have been prepared according to the criteria set forth in these Instructions and those in Rapid Review, the acceptance procedure will be completed successfully. If there are problems that would cause extensive corrections to be made at the copyediting stage or if the files are not acceptable for production, ASM Journals staff will contact the corresponding author. Once all the material intended for publication has been determined to be adequate, the manuscript is scheduled for the next available issue and an acceptance letter indicating the month of publication, approximate page proof dates, and table of contents section is mailed to the corresponding author; a copyright transfer agreement is also included, as is a license to permit posting of supplemental material (if applicable). The editorial staff of the ASM Journals Department completes the editing of the manuscript to bring it into conformity with prescribed standards.

AEM Accepts

For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "[journal acronym] Accepts" (e.g., AEM Accepts) and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset articles are published. They are posted "as is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage) and do not reflect ASM editorial changes. No corrections/changes to the PDF manuscripts are accepted. Accordingly, there likely will be differences between the AEM Accepts manuscripts and the final, typeset articles. The manuscripts remain listed on the AEM Accepts page until the final, typeset articles are posted. At that point, the manuscripts are removed from the AEM Accepts page. The manuscripts are under subscription access control until 6 months after the typeset articles are posted, when free access is provided to everyone (subject to the applicable ASM license terms and conditions). Supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

Instructions on how to cite such manuscripts may be found in "References."

Page Proofs

Page proofs, together with a query sheet and instructions for handling proofs, will be made available to the corresponding author electronically via a PDF file that can be accessed through a unique password. Since corresponding authors will be notified of the availability of their PDF proofs, instructed how to access information about page charges, reprints, and color figure charges (if applicable), and assigned their unique password via e-mail, an e-mail address must be supplied in the correspondent footnote. Failure to do so may result in a delay in publication. **The PDF page proofs must be printed out, and corrections must be written on the hard copy.** Queries must be answered on the query page or on a separate sheet of paper, and any changes related to the queries must be indicated on the proofs. Note that the copy editor does not query at every instance where a change has been made. Queries are written only to request necessary information or clarification of an unclear passage or to draw attention to edits that may have altered the sense. It is the author's responsibility to read the entire text, tables, and figure legends, not just items queried. As soon as the page proofs are corrected and signed by the person who proofread them (within 48 h), **they should be mailed or sent by a courier service** such as FedEx, **not** faxed or sent as an e-mail attachment, to the ASM Journals Department, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904.

The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions. Figures as they appear in the proofs are for validation of content and placement, not quality of reproduction or color accuracy. Print output of figures in the PDF page proofs will be of lower quality than the same figures viewed on a monitor. Please avoid making changes to figures based on quality of color or reproduction in proof.

Important new information that has become available between acceptance of the manuscript and receipt of the proofs may be inserted as an addendum in proof with the permission of the editor. If references to unpublished data or personal communications are added, it is expected that written assurance granting permission for the citation will be included. Limit changes to correction of spelling errors, incorrect data, and grammatical errors and updated information for references to articles that have been submitted or are in press. If URLs have been provided in the article, recheck the sites to ensure that the addresses are still accurate and the material that you expect the reader to find is indeed there.

Questions about late proofs and problems in the proofs should be directed to the ASM Journals Department (e-mail, bslinker@asmusa.org; telephone, 202-942-9219). Questions about accessing or viewing your PDF proofs should be directed to Katie Gay of Cadmus Communications at 804-261-3155 or gayk@cadmus.com.

PDF Files

A corresponding author who has included an e-mail address in his/her "corresponding author" footnote will have limited access (10 downloads, total) to the PDF file of his/her published article. An e-mail alert will automatically be sent to him/her on the day the issue is posted. It will provide a URL, which will be required to obtain access, and instructions. An article may be viewed, printed, or stored, provided that it is for the author's own use.

Should coauthors or colleagues be interested in viewing the paper for their own use, the corresponding author may provide them with the URL; a copy of the article may not be forwarded electronically. However, they must be made aware of the terms and conditions of the ASM copyright. (For details, go to <http://www.journals.asm.org/misc/terms.dtl>.) Note that each such download will count toward the corresponding author's total of 10. After 10 downloads, access will be denied and can be obtained only through a subscription to the journal (either individual or institutional) or after the standard access control has been lifted (i.e., 6 months after publication).

Publication Fees

Page charges.

Authors whose research was supported by grants, special funds (including departmental and institutional), or contracts (including governmental) or whose research was done as part of their official duties (government or corporate, etc.) are required to pay page charges (based on the number of typeset pages, including illustrations, in the article).

For a **corresponding author who is an ASM member**, page charges are currently \$65 per page for the first eight pages and \$125 per page for each page in excess of eight (subject to change without notice). To obtain the member rate, the corresponding author must be an ASM member.

For a **nonmember corresponding author**, page charges are currently \$75 per page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight (subject to change without notice). A corresponding author who is not an ASM member may join ASM to obtain the member rate.

If the research was not supported by any of the means described above, a request to waive the charges may be sent to the Journals Department, ASM, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904, USA (fax, 202-942-9355; e-mail, aluckey@asmusa.org). The request must include the manuscript control number assigned by ASM and must indicate how the work was supported.

Minireviews, Commentaries, and Comment Letters to the Editor are not subject to page charges.

Color charges.

The cost of publishing in color must be borne by the author.

For a corresponding author who is an ASM member, color charges are currently \$170 per color figure (subject to change without notice).

For a nonmember corresponding author, color charges are currently \$375 per color figure (subject to change without notice). A corresponding author who is not an ASM member may join ASM to obtain the member rate.

Minireviews, Commentaries, and Comment Letters to the Editor are not subject to color charges.

Reprints.

Reprints (in multiples of 100) may be purchased by all coauthors. In the proof notification e-mail, the corresponding author will be instructed how to access information about reprints.

The corresponding authors of Minireviews and Commentaries may receive 100 free reprints of their contribution; additional reprints (in multiples of 100) may be purchased if desired. As for regular articles, the corresponding author will be instructed, in the proof notification e-mail, how to access information about reprints.

Supplemental material fee.

Authors are charged a flat fee for posting supplemental material as an adjunct to their published article. For 2010, the fee is \$190. (Exceptions: No fee is charged for supplemental material associated with Minireviews or Commentaries.)

Optional open access fee.

Author-paid optional open access (OOA) is now available for all article types. The 2010 fee is \$2,000. This fee is in addition to any page charges, color charges, or supplemental material charges and permits immediate public access to both the preliminary "Accepts" version and the copyedited, typeset version published in the online journal. This option is in addition to the open access already provided through NIH's PubMed Central repository; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication.

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the *ASM Style Manual for Journals* (American Society for Microbiology, 2010, in-house document) and *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 6th ed. (Greenwood Press, Westport, CT, 2006), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and references, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages should have line numbers; manuscripts without line numbers may be editorially rejected by the editor, with a suggestion of resubmission after line numbers are added. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter "oh" (O); the numeral one (1), the letter "el" (l), and the letter "eye" (I); and a multiplication sign (x) and the letter "ex" (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the

"insert symbol" function. Set the page size to 8 **1/2** by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.

Manuscript Submission Checklist:

- Double-space all text, including references and figure legends
- Number pages
- Number lines
- Present statistical treatment of data where appropriate
- Format references in ASM style
- Indicate journal section for manuscript publication
- Provide accession numbers for all sequences or sequence alignments important for evaluation of the manuscript as supplemental material or make the material available on a website for access by the editor and reviewers
- Confirm that genetic and chemical nomenclature conforms to instructions
- Include as supporting material in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript

Long-Form Papers

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

Title, running title, and byline.

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

Study group in byline.

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

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

Correspondent footnote.

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

Abstract.

Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the References section but omit the article title. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction.

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

Materials and Methods.

The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of

centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state "cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)" rather than to state "cells were broken as previously described (9)." This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, equipment, and microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc. Parameters such as temperature, pH, and salinity (or conductivity) must be reported for environmental samples that are extracted for molecular analyses. A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results.

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

Discussion.

The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments.

The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: "This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute." Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes.

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

References.

(i) *References listed in the References section.*

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

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

1. Alexander, T. W., L. J. Yanke, E. Topp, M. E. Olson, R. R. Read, D. W. Morck, and T. A. McAllister. 2008. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4405-4416.
2. Cox, C. S., B. R. Brown, and J. C. Smith. *J. Gen. Genet.*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
3. da Costa, M. S., M. F. Nobre, and F. A. Rainey. 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295, ^{AL} emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p. 404-414. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 1. Springer, New York, NY.
4. Elder, B. L., and S. E. Sharp. 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, DC.
5. Falagas, M. E., and S. K. Kasiakou. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2274-2275. (Letter.) {"Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry.}

6. **Fitzgerald, G., and D. Shaw.** In A. E. Waters (ed.), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co., Boston, MA.*
{Chapter title is optional.}
7. **Forman, M. S., and A. Valsamakis.** 2003. Specimen collection, transport, and processing: virology, p. 1227-1241. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
8. **Garcia, C. O., S. Paira, R. Burgos, J. Molina, J. F. Molina, and C. Calvo.** 1996. Detection of salmonella DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients. *Arthritis Rheum.* **39**(Suppl.):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}
9. **Green, P. N., D. Hood, and C. S. Dow.** 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p. 251-254. In R. L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbial growth on C₁ compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. **Odell, J. C.** April 1970. Process for batch culturing. U.S. patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory.}
11. **O'Malley, D. R.** 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles, CA. {Title is optional.}
12. **Rotimi, V. O., N. O. Salako, E. M. Mohaddas, and L. P. Philip.** 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. D-1658. {Abstract title is optional.}
13. **Smith, D., C. Johnson, M. Maier, and J. J. Maurer.** 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr. P-038, p. 445. Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. {Abstract title is optional.}
14. **Stratagene.** 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., AEM00577-10) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

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

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

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

(ii) References cited in the text.

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

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

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

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

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

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

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

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

(iii) References related to supplemental material.

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

(iv) *Referencing ASM Accepts (publish-ahead-of-print) manuscripts.*

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

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

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

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

Short-Form Papers

The short-form format is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. Submit short-form papers in the same way as full-length papers. They receive the same review, they are not published more rapidly than full-length papers, and they are not considered preliminary communications.

The title, running title (not to exceed 54 characters and spaces), byline, and correspondent footnote should be prepared as for the long-form paper. Each short-form paper must have an abstract of no more than 50 words. Do not use section headings in the body of the paper; combine methods, results, and discussion in a single section. Paragraph lead-ins are permissible. The text should be kept to a minimum and, if possible, should not exceed 1,000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum. Materials and methods should be described in the text, not in figure legends or table footnotes. Present acknowledgments as in long-form papers, but do not use a heading. The References section is identical to that of long-form papers.

Minireviews

Minireviews are brief (**limit of six printed pages exclusive of references**) biographical profiles, historical perspectives, or summaries of developments in fast-moving areas. They must be based on published articles; they may address any subject within the scope of AEM.

Minireviews may be either solicited or proffered by authors responding to a recognized need. Irrespective of origin, Minireviews are subject to review and should be submitted via Rapid Review. The cover letter should state whether the article was solicited and by whom.

Minireviews must have abstracts. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. The body of the Minireview may have section headings and/or paragraph lead-ins.

Author biographies.

At the editor's invitation, corresponding authors of Minireviews may submit brief biographical sketches (limit, 150 words) of each contributing author, to be published at the end of the article. If the editor asks you to submit a modified manuscript, you should submit biographical text and photos with your modification.

Meeting Reviews

Meeting Reviews are brief summaries of recent scientific meetings that cover topics within the scope of AEM. Reviews should be timely and focus on major themes, new developments, emerging trends, and significant unanswered questions presented and discussed at the meeting. Sufficient background should be provided to make the report useful to the general reader. The author must provide written assurance from the relevant individuals that permission to cite their presented material has been granted. Meeting Reviews, which may be solicited or proffered by authors, are subject to editorial review and should be submitted via Rapid Review.

Commentaries

Commentaries are invited communications concerning topics relevant to the readership of AEM and are intended to engender discussion. Reviews of the literature, methods and other how-to papers, and responses targeted at a specific published paper are not appropriate. Commentaries are subject to review.

The length may not exceed four printed pages, and the format is like that of a Minireview (see above).

Letters to the Editor

Letters to the Editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (not on publish-ahead-of-print manuscripts) and must cite published references to support the writer's argument.

Letters may be **no more than 500 words long and must be typed double-spaced**. Refer to a recently published Letter for correct formatting. Note that authors and affiliations are listed at the foot of the Letter. Provide only the primary affiliation for each author.

All Letters to the Editor must be submitted electronically, and the manuscript type (Comment Letter) must be selected from the drop-down list in the submission form. The cover letter should state the volume and issue in which the article commented on was published, the title of the article, and the last name of the first author. In the Abstract section of the submission form, put "Not

Applicable." Letters to the Editor do not have abstracts. The Letter must have a title, which must appear on the manuscript and on the submission form. Figures and tables should be kept to a minimum. The Letter will be sent to the editor who handled the article in question. If the editor believes that publication is warranted, he/she will solicit a reply from the corresponding author of the article and make a recommendation to the editor in chief. Final approval for publication rests with the editor in chief. Please note that some indexing/abstracting services do not include Letters to the Editor in their databases.

Errata

The Erratum section provides a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or publication (e.g., a misspelling, a dropped word or line, or mislabeling in a figure) of a published article. Submit Errata via Rapid Review (see "Submission, Review, and Publication Processes"). In the Abstract section of the submission form (a required field), put "Not Applicable." Upload the text of your Erratum as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting.

Authors' Corrections

The Author's Correction section provides a means of correcting errors of omission (e.g., author names or citations) and errors of a scientific nature that do not alter the overall basic results or conclusions of a published article (e.g., an incorrect unit of measurement or order of magnitude used throughout, contamination of one of numerous cultures, or misidentification of a mutant strain, causing erroneous data for only a portion [noncritical] of the study). Note that the addition of new data is not permitted. For corrections of a scientific nature or issues involving authorship, including contributions and use or ownership of data and/or materials, all disputing parties must agree, in writing, to publication of the Correction. For omission of an author's name, letters must be signed by the authors of the article and the author whose name was omitted. The editor who handled the article will be consulted if necessary.

Submit an Author's Correction via Rapid Review (see "Submission, Review, and Publication Processes"). In the submission form, select Erratum as the manuscript type; there is no separate selection in Rapid Review for an Author's Correction, but your Correction will be published as such if appropriate. In the Abstract section of the submission form (a required field), put "Not Applicable." Upload the text of your Author's Correction as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting. Signed letters of agreement must be supplied as supplemental material (scanned PDF files).

Retractions

Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article. Submit Retractions via Rapid Review (see "Submission, Review, and Publication Processes"). In the Abstract section of the submission form (a required field), put "Not Applicable." Upload the text of your Retraction as a Microsoft Word file. Letters of agreement signed by all of the authors must be supplied as supplemental material (scanned PDF files). The Retraction will be assigned to the editor in chief of the journal, and the editor who handled the paper and the chairman of the ASM Publications Board will be consulted. If all parties agree to the publication and content of the Retraction, it will be sent to the JournalsDepartment for publication.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Illustrations

Image manipulation.

Computer-generated images may be processed only minimally. Processing (e.g., changing contrast, brightness, or color balance) is acceptable only if applied to all parts of the image, as well as to the controls, equally, and descriptions of all such adjustments and the tools used (both hardware and software) must be provided in the manuscript. Unprocessed data and files must be retained by the authors and be provided to the editor on request.

File types and formats.

Illustrations may be continuous-tone images, line drawings, or composites. Color graphics may be submitted, but the cost of printing in color must be borne by the author. Suggestions about how to reduce costs and ensure accurate color reproduction are given below. On initial submission, illustrations should be supplied as PDF files, with the legend on the same page, to assist review. At the modification stage, production-quality digital files must be provided, along with text files for the legends. The legends are copyedited and typeset for final publication, not included as part of the figure itself. All graphics submitted with modified manuscripts must be bitmap, grayscale, or in the RGB (preferred) or CMYK color mode. See "Color illustrations." Halftone images (those with various densities or shades) must be grayscale, not bitmap. AEM accepts TIFF or EPS files but discourages PowerPoint for either black-and-white or color images. For instructions on creating acceptable EPS and TIFF files, refer to the Cadmus digital art website, <http://art.cadmus.com/da/index.jsp>. PowerPoint requires users to pay close attention to the fonts used in their images (see the section on fonts below). If instructions for fonts are not followed exactly, images prepared for publication are subject to missing characters, improperly converted characters, or shifting/obscuring of elements or text in the figure. For proper font use in PowerPoint images, refer to the Cadmus digital art website, http://art.cadmus.com/da/instructions/ppt_disclaimer.jsp.

We strongly recommend that before returning their modified manuscripts, authors check the acceptability of their digital images for production by running their files through Rapid Inspector, a tool provided at the following

URL: <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zmw/index.jsp>. Rapid Inspector is an easy-to-use, Web-based application that identifies file characteristics that may render the image unusable for production. If you require additional information, please send an e-mail inquiry to digitalart@cadmus.com.

Minimum resolution.

It is extremely important that a high enough resolution is used. All separate images that you import into a figure file must be at the correct resolution before they are placed. (For instance, placing a 72-dpi image in a 300-dpi EPS file will not result in the placed image meeting the minimum requirements for file resolution.) Note, however, that the higher the resolution, the larger the file and the longer the upload time. Publication quality will not be improved by using a resolution higher than the minimum. Minimum resolutions are as follows:

300 dpi for grayscale and color

600 dpi for combination art (lettering and images)

1,200 dpi for line art

Size.

All graphics **should be submitted at their intended publication size**; that is, the image uploaded should be 100% of its print dimensions so that no reduction or enlargement is necessary. Resolution must be at the required level at the submitted size. Include only the significant portion of an illustration. Whitespace must be cropped from the image, and excess space between panel labels and the image must be eliminated.

Maximum width for a 1-column figure: $3\frac{1}{8}$ inches (ca. 8.4 cm)

Maximum width for a 2-column figure: $6\frac{7}{8}$ inches (ca. 17.4 cm)

Minimum width for a 2-column figure: $4\frac{1}{4}$ inches (10.8 cm)

Maximum height: $9\frac{1}{8}$ inches (23.0 cm)

Contrast.

Illustrations must contain sufficient contrast to be viewed easily on a monitor or on the printed page.

Labeling and assembly.

All final lettering and labeling must be incorporated into the figures. On initial submission, illustrations should be provided as PDF files, with the legend beneath each image, to assist review. At the modification stage, production quality digital figure files must be provided, along with text files for the legends. Put the figure number well outside the boundaries of the image itself. (Numbering may need to be changed at the copyediting stage.) Each figure must be uploaded as a separate file, and any multipanel figures must be assembled into one file; i.e., rather than uploading a separate file for each panel in a figure, assemble all panels in one piece and supply them as one file.

Fonts.

To avoid font problems, set all type in one of the following fonts: Arial, Helvetica, Times Roman, European PI, Mathematical PI, or Symbol. Courier may be used but should be limited to nucleotide or amino acid sequences, where a nonproportional (monospace) font is required. All fonts other than these must be converted to paths (or outlines) in the application with which they were created.

Compression.

Images created with Macintosh applications may be compressed with Stuffit. Images created with Windows applications may be compressed with WinZip or PKZIP.

Color illustrations.

Color costs must be borne by the author. See "Publication Fees." All figures submitted in color will be processed as color. Adherence to the following guidelines will help to minimize costs and to ensure color reproduction that is as accurate as possible. The online version is considered the version of record for AEM and all other ASM journals. To maximize online reproduction, color illustrations should be supplied in the RGB color mode, as either (i) RGB TIFF images with a resolution of at least 300 pixels per inch (raster files, consisting of pixels) or (ii) Illustrator-compatible EPS files with RGB color elements (vector files, consisting of lines, fonts, fills, and images). CMYK files are also accepted. Other than in color space, CMYK files must meet the same production criteria as RGB files. The RGB color space is the native color space of computer monitors and of most of the equipment and software used to capture scientific data, and it can display a wider range of colors (especially bright fluorescent hues) than the CMYK (cyan, magenta, yellow, black) color space used by print devices that put ink (or toner) on paper. For the print version (and reprints), ASM's print provider will automatically create CMYK versions of color illustrations from the supplied RGB versions. Color in the print journal may not match that in the online journal of record because of the smaller range of colors capable of being reproduced by CMYK inks on a printing press. For additional information on RGB versus CMYK color, refer to the Cadmus digital art site, http://art.cadmus.com/da/guidelines_rgb.jsp.

Drawings

Submit graphs, charts, complicated chemical or mathematical formulas, diagrams, and other drawings as finished products not requiring additional artwork or typesetting. All elements, including letters, numbers, and symbols, must be easily readable, and both axes of a graph must be labeled. Keep in mind that the journal is published both in print and online and that the same electronic files submitted by the authors are used to produce both.

When creating line art, please use the following guidelines:

- i. **All art must be submitted at its intended publication size.** For acceptable dimensions, see "Size," above.

- ii. **Avoid using screens (i.e., shading) in line art.** It can be difficult and time-consuming to reproduce these images without moiré patterns. Various pattern backgrounds are preferable to screens as long as the patterns are not imported from another application. If you must use images containing screens,
 - a. Generate the image at line screens of 85 lines per inch or lower.
 - b. When applying multiple shades of gray, differentiate the gray levels by at least 20%.
 - c. Never use levels of gray below 5% or above 95% as they are likely to fade out or become totally black when output.
- iii. Use thick, solid lines that are no finer than 1 point in thickness.
- iv. No type should be smaller than 6 points at the final publication size.
- v. Avoid layering type directly over shaded or textured areas.
- vi. Avoid the use of reversed type (white lettering on a black background).
- vii. Avoid heavy letters, which tend to close up, and unusual symbols, which the printer may not be able to reproduce in the legend.
- viii. If colors are used, avoid using similar shades of the same color and avoid very light colors.

In figure ordinate and abscissa scales (as well as table column headings), avoid the ambiguous use of numbers with exponents. Usually, it is preferable to use the *Système International d'Unités* (SI) symbols (μ for 10^{-6} , m for 10^{-3} , k for 10^3 , and M for 10^6 , etc.). A complete listing of SI symbols can be found in the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) publication *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry* (RSC Publishing, Cambridge, United Kingdom, 2007); an abbreviated list is available at <http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>. Thus, representation of 20,000 cpm on a figure ordinate should be made by the number 20 accompanied by the label kcpm.

When powers of 10 must be used, the journal requires that the exponent power be associated with the number shown. In representing 20,000 cells per ml, the numeral on the ordinate should be "2" and the label should be " 10^4 cells per ml" (not "cells per ml $\times 10^{-4}$ "). Likewise, an enzyme activity of 0.06 U/ml might be shown as 6 accompanied by the label 10^{-2} U/ml. The preferred designation is 60 mU/ml (milliunits per milliliter).

Presentation of Nucleic Acid Sequences

Long nucleic acid sequences must be presented as figures in the following format to conserve space. Print the sequence in lines of approximately 100 to 120 nucleotides in a nonproportional (monospace) font that is easily legible when published with a line length of 6 inches (ca. 15.2 cm). If possible, lines of nucleic acid sequence should be further subdivided into blocks of 10 or 20 nucleotides by spaces within the sequence or by marks above it. Uppercase and lowercase letters may be used to designate the exon-intron structure or transcribed regions, etc., if the lowercase letters remain legible at a 6-inch (ca. 15.2-cm) line length. Number the sequence line by line; place numerals representing the first base of each line to the left of the lines. Minimize spacing between lines of sequence, leaving room only for annotation of the sequence. Annotation may include boldface, underlining, brackets, and boxes, etc. Encoded amino acid sequences may be presented, if necessary, immediately above or below the first nucleotide of each codon, by using the single-letter amino acid symbols. Comparisons of multiple nucleic acid sequences should conform as closely as possible to the same format.

Figure Legends

On initial submission, to assist review, the legend should be incorporated in the image file and appear beneath the figure. At the modification stage, figure legends must be provided as text files separate from the image file. Legends should provide enough information so that the figure is understandable without frequent reference to the text. However, detailed experimental methods must be described in the Materials and Methods section, not in a figure legend. A method that is unique to one of several experiments may be reported in a legend only if the discussion is very brief (one or two sentences). Define all symbols used in the figure and define all abbreviations that are not used in the text.

Tables

Tables that contain artwork, chemical structures, or shading must be submitted as illustrations in an acceptable format at the modification stage. The preferred format for regular tables is Microsoft Word; however, WordPerfect and Acrobat PDF are also acceptable. Note that a straight Excel file is not currently an acceptable format. Excel files must be either embedded in a Word or WordPerfect document or converted to PDF before being uploaded. **If your modified manuscript contains PDF tables, select "for reviewing purposes only" at the beginning of the file upload process.**

Tables should be formatted as follows. Arrange the data so that **columns of like material read down, not across**. The headings should be sufficiently clear so that the meaning of the data is understandable without reference to the text. See the "Abbreviations" section of these Instructions for those that should be used in tables. Explanatory footnotes are acceptable, but more-extensive table "legends" are not. Footnotes should not include detailed descriptions of the experiment. Tables must include enough information to warrant table format; those with fewer than six pieces of data will be incorporated into the text by the copy editor. Table 1 is an example of a well-constructed table.

Cover Photographs and Drawings

AEM publishes photographs and drawings on the front cover. Since we still want to optimize print presentation for covers even though the online journal is the journal of record (see above), color cover art must be prepared in the CMYK color space. Invitations are issued to authors whose manuscripts are returned for modification or whose manuscripts have been accepted for publication in AEM; material should be related to the work presented in the AEM manuscript. Unsolicited photos will be considered in hard-copy format (two copies) only; if an unsolicited photo is chosen for the cover, the author may be asked to submit digital files. No material submitted for consideration will be returned to the author. Authors will be notified only if their cover art is selected. Copyright for the chosen material must be transferred to ASM. A short description of the cover material will be included at the end of the table of contents or the author index of the issue. Technical specifications for submission are available from the cover editor, Matthew R. Parsek (parsem@u.washington.edu).

NOMENCLATURE

Chemical and Biochemical Nomenclature

The recognized authority for the names of chemical compounds is *Chemical Abstracts* (CAS; <http://www.cas.org/>) and its indexes. *The Merck Index*, 14th ed. (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006), is also an excellent source. For biochemical terminology, including abbreviations and symbols, consult *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (Portland Press, London, United Kingdom, 1992), available at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html>, and the instructions to authors of the *Journal of Biological Chemistry* and the *Archives of Biochemistry and Biophysics* (first issues of each year). Do not express molecular weight in daltons; molecular weight is a unitless ratio. Molecular mass is expressed in daltons. For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (IUB) as described in *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, Inc., New York, NY, 1992) and at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. If a nonrecommended name is used, place the proper (trivial) name in parentheses at first use in the abstract and text. Use the EC number when one has been assigned. Authors of papers describing enzymological studies should review the standards of the STREND A Commission for information required for adequate description of experimental conditions and for reporting enzyme activity data (<http://www.strenda.org/documents.html>).

Nomenclature of Microorganisms

Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Escherichia coli*), must be used for all microorganisms. Names of categories at or above the genus level may be used alone, but specific and subspecific epithets may not. A specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper. Thereafter, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (e.g., *E. coli*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper. Names of all taxa (kingdoms, phyla, classes, orders, families, genera, species, and subspecies) are printed in italics and should be italicized in the manuscript; strain designations and numbers are not. Vernacular (common) names should be in lowercase roman type (e.g., streptococcus, brucella). For *Salmonella*, genus, species, and subspecies names should be rendered in standard form: *Salmonella enterica* at first use, *S. enterica* thereafter; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* at first use, *S. enterica* subsp. *arizonae* thereafter. Names of serovars should be in roman type with the first letter capitalized: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. After the first use, the serovar may also be given without a species name: *Salmonella* Typhimurium, or *Salmonella* serovar Typhimurium. For other information regarding serovar designations, see *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, 9th ed. (P. A. D. Grimont and F.-X. Weill, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France, 2007; see http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/salmoms/WKLM_2007.pdf). For a summary of the current standards for *Salmonella* nomenclature and the Kaufmann-White criteria, see the article by Brenner et al. (*J. Clin. Microbiol.* **38**:2465-2467, 2000), the opinion of the Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:519-520, 2005), and the article by Tindall et al. (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:521-524, 2005).

The spelling of bacterial names should follow the *Approved Lists of Bacterial Names (Amended) & Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes* (V. B. D. Skerman et al., ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1989) and the validation lists and notification lists published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (formerly the *International Journal of Systematic Bacteriology*) since January 1989. In addition, two sites on the World Wide Web list current approved bacterial names: Bacterial Nomenclature Up-to-Date (http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14) and the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>). If there is reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be enclosed in quotation marks in the title and at its first use in the abstract and the text and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text. "*Candidatus*" species should always be set in quotation marks.

For guidelines regarding new names and descriptions of new genera and species, see the articles by Tindall (*Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1309-1312, 1999) and Stackebrandt et al. (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1043-1047, 2002). To validate new names and/or combinations, authors must submit three copies of their published article to the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

It is recommended that a strain be deposited in at least two recognized culture collections in different countries when that strain is necessary for the description of a new taxon (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:2239-2244, 2000). Since the classification of fungi is not complete, it is the responsibility of the author to determine the accepted binomial for a given organism. Sources for these names include *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th ed. (C. P. Kurtzman and J. W. Fell, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 1998), and *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. (P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David, and J. A. Stalpers, ed., CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom, 2001); see also <http://www.speciesfungorum.org/Names/Fundic.asp>.

Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and reported on the ICTV Virus Taxonomy website (<http://www.ictvonline.org/index.asp>). In addition, the recommendations of the ICTV regarding the use of species names should generally be followed: when the entire species is discussed as a taxonomic entity, the species name, as with other taxa, is italic and has the first letter and any proper nouns capitalized (e.g., *Tobacco mosaic virus*, *Murray Valley encephalitis virus*). When the behavior or manipulation of individual viruses is discussed, the vernacular (e.g., tobacco mosaic virus, Murray Valley encephalitis virus) should be used. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Microorganisms, viruses, and plasmids should be given designations consisting of letters and serial numbers. It is generally advisable to include a worker's initials or a descriptive symbol of locale or laboratory, etc., in the designation. Each new strain, mutant, isolate, or derivative should be given a new (serial) designation. This designation should be distinct from those of the genotype and phenotype, and genotypic and phenotypic symbols should not be included. Plasmids are named with a lowercase "p"

followed by the designation in uppercase letters and numbers. To avoid the use of the same designation as that of a widely used strain or plasmid, check the designation against a publication database such as Medline. For submissions on the topic of probiotics, the Food and Agriculture Organization and World Health Organization (FAO/WHO) definition must be used: "live microorganisms, which when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host." To avoid any misrepresentation of how this term should be applied, authors are encouraged to read the FAO/WHO Guidelines published in 2002 (<http://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>).

Genetic Nomenclature

To facilitate accurate communication, **it is important that standard genetic nomenclature be used whenever possible and that deviations or proposals for new naming systems be endorsed by an appropriate authoritative body.** Review and/or publication of submitted manuscripts that contain new or nonstandard nomenclature may be delayed by the editor or the Journals Department so that they may be reviewed by the Genetics and Genomics Committee of the ASM Publications Board.

Before submission of manuscripts, authors may direct questions on genetic nomenclature to the committee's chairman: Maria Costanzo (maria@genome.stanford.edu). Such a consultation should be mentioned in the manuscript submission letter.

Bacteria.

The genetic properties of bacteria are described in terms of phenotypes and genotypes. The phenotype describes the observable properties of an organism. The genotype refers to the genetic constitution of an organism, usually in reference to some standard wild type. The guidelines that follow are based on the recommendations of Demerec et al. (Genetics 54:61-76, 1966).

(i) Phenotypic designations must be used when mutant loci have not been identified or mapped. They can also be used to identify the protein product of a gene, e.g., the OmpA protein. Phenotypic designations generally consist of three-letter symbols; these are not italicized, and the first letter of the symbol is capitalized. It is preferable to use Roman or Arabic numerals (instead of letters) to identify a series of related phenotypes. Thus, a series of nucleic acid polymerase mutants might be designated Pol1, Pol2, and Pol3, etc. Wild-type characteristics can be designated with a superscript plus (Pol⁺), and, when necessary for clarity, negative superscripts (Pol⁻) can be used to designate mutant characteristics. Lowercase superscript letters may be used to further delineate phenotypes (e.g., Str^r for streptomycin resistance). Phenotypic designations should be defined.

(ii) Genotypic designations are also indicated by three-letter locus symbols. In contrast to phenotypic designations, these are lowercase italic (e.g., *ara his rps*). If several loci govern related functions, these are distinguished by italicized capital letters following the locus symbol (e.g., *araA araB araC*). Promoter, terminator, and operator sites should be indicated as described by Bachmann and Low (Microbiol. Rev. 44:1-56, 1980), e.g., *lacZp*, *lacAt*, and *lacZo*.

(iii) Wild-type alleles are indicated with a superscript plus (*ara⁺ his⁺*). A superscript minus is not used to indicate a mutant locus; thus, one refers to an *ara* mutant rather than an *ara⁻* strain.

(iv) Mutation sites are designated by placing serial isolation numbers (allele numbers) after the locus symbol (e.g., *araA1 araA2*). If it is not known in which of several related loci the mutation has occurred, a hyphen is used instead of the capital letter (e.g., *ara-23*). It is essential in papers reporting the isolation of new mutants that allele numbers be given to the mutations. For *Escherichia coli*, there is a registry of such numbers: *E. coli* Genetic Stock Center, Department of Biology, Yale University, New Haven, CT 06511-5188. For the genus *Salmonella*, the registry is *Salmonella* Genetic Stock Center, Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 1N4, Canada. For the genus *Bacillus*, the registry is *Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio State University, Columbus, OH 43210.

(v) The use of superscripts with genotypes (other than + to indicate wild-type alleles) should be avoided. Designations indicating amber mutations (Am), temperature-sensitive mutations (Ts), constitutive mutations (Con), cold-sensitive mutations (Cs), production of a hybrid protein (Hyb), and other important phenotypic properties should follow the allele number [e.g., *araA230*(Am) *hisD21*(Ts)]. All other such designations of phenotype must be defined at the first occurrence. If superscripts must be used, they must be approved by the editor and defined at the first occurrence in the text. Subscripts may be used in two situations. Subscripts may be used to distinguish between genes (having the same name) from different organisms or strains; e.g., *hisE_{coli}* or *hisK_{K-12}* for the *his* gene of *E. coli* or strain K-12, respectively, may be used to distinguish this gene from the *his* gene in another species or strain. An abbreviation may also be used if it is explained. Similarly, a subscript is also used to distinguish between genetic elements that have the same name. For example, the promoters of the *gln* operon can be designated *glnAp₁* and *glnAp₂*. This form departs slightly from that recommended by Bachmann and Low (e.g., *desC1p*).

(vi) Deletions are indicated by the symbol Δ placed before the deleted gene or region, e.g., Δ *trpA432*, Δ (*aroP-aceE*)419, or Δ (*hisQ-hisJ*)1256. Similarly, other symbols can be used (with appropriate definition). Thus, a fusion of the *ara* and *lac* operons can be shown as Φ (*ara-lac*)95. Likewise, Φ (*araB⁻-lacZ⁺*)96 indicates that the fusion results in a truncated *araB* gene fused to an intact *lacZ* gene, and Φ (*malE-lacZ*)97(Hyb) shows that a hybrid protein is synthesized. An inversion is shown as IN(*rrnD-rrnE*)1. An insertion of an *E. coli his* gene into plasmid pSC101 at zero kilobases (0 kb) is shown as pSC101 Ω (0kb::K-12*hisB*)4. An alternative designation of an insertion can be used in simple cases, e.g., *galT236::Tn5*. The number 236 refers to the locus of the insertion, and if the strain carries an additional *gal* mutation, it is listed separately. Additional examples, which utilize a slightly different format, can be found in the papers by Campbell et al. and Novick et al. cited below. It is important in reporting the construction of strains in which a mobile element was inserted and subsequently deleted that this fact be noted in the strain table. This can be done by listing the genotype of the strain used as an intermediate in a table footnote or by making a direct or parenthetical remark in the genotype, e.g., (F⁻), Δ Mu cts, or *mal::* Δ Mu cts::*lac*. In setting parenthetical remarks within the genotype or dividing the genotype into constituent elements, parentheses and brackets are used without special meaning; brackets are used outside parentheses. To indicate the presence of an episome, parentheses (or brackets) are used (Δ F⁺). Reference to an integrated episome is indicated as described above for inserted elements, and an exogenote is shown as, for example, W3110/F⁺8(*gal⁺*).

For information about the symbols in current use, consult Berlyn (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:814-984, 1998) for *E. coli* K-12, Sanderson and Roth (Microbiol. Rev. 52:485-532, 1988) for *Salmonella* serovar Typhimurium, Holloway et al. (Microbiol. Rev. 43:73-102, 1979) for the genus *Pseudomonas*, Piggot and Hoch (Microbiol. Rev. 49:158-179, 1985) for *Bacillus subtilis*, Perkins et al. (Microbiol. Rev. 46:426-570, 1982) for *Neurospora crassa*, and Mortimer and Schild (Microbiol. Rev. 49:181-213,

1985) for *Saccharomyces cerevisiae*. For yeasts, *Chlamydomonas* spp., and several fungal species, symbols such as those given in the *Handbook of Microbiology*, 2nd ed. (A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, ed., CRC Press, Inc., Cleveland, OH, 1988), should be used.

Conventions for naming genes. It is recommended that (entirely) new genes be given names that are mnemonics of their function, avoiding names that are already assigned and earlier or alternative gene names, irrespective of the bacterium for which such assignments have been made. Similarly, it is recommended that, whenever possible, orthologous genes present in different organisms receive the same name. When homology is not apparent or the function of a new gene has not been established, a provisional name may be given by one of the following methods. (i) The gene may be named on the basis of its map location in the style *yaaA*, analogous to the style used for recording transposon insertions (*zef*) as discussed below. A list of such names in use for *E. coli* has been published by Rudd (Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:985-1019, 1998). (ii) A provisional name may be given in the style described by Demerec et al. (e.g., *usg*, gene upstream of *folC*). Such names should be unique, and names such as *orf* or *genX* should not be used. For reference, the *E. coli* Genetic Stock Center's database includes an updated listing of *E. coli* gene names and gene products. It is accessible on the Internet (<http://cgsc.biology.yale.edu/index.php>). The Center's relational database can also be searched via Telnet; for access, send a request to berlyn@cgsc.biology.yale.edu. A list can also be found in the work of Riley (Microbiol. Rev. **57**:862-952, 1993). For the genes of other bacteria, consult the references given above.

For prokaryotes, gene names should not begin with prefixes indicating the genus and species from which the gene is derived. (However, subscripts may be used where necessary to distinguish between genes from different organisms or strains, as described in section v of "Bacteria" above.) For eukaryotes, such prefixes may be used for clarity when discussing genes with the same name from two different organisms (e.g., *ScURA3* versus *CaURA3*); the prefixes are not considered part of the gene name proper and are not italicized.

Locus tags.

Locus tags are systematic, unique identifiers that are assigned to each gene in GenBank. All genes mentioned in a manuscript should be traceable to their sequences by the reader, and locus tags may be used for this purpose in manuscripts to identify uncharacterized genes. In addition, authors should check GenBank to make sure that they are using the correct, up-to-date format for locus tags (e.g., uppercase versus lowercase letters and presence or absence of an underscore, etc.). Locus tag formats vary between different organisms and also may be updated for a given organism, so it is important to check GenBank at the time of manuscript preparation.

"Mutant" versus "mutation."

Keep in mind the distinction between a mutation (an alteration of the primary sequence of the genetic material) and a mutant (a strain carrying one or more mutations). One may speak about the mapping of a mutation, but one cannot map a mutant. Likewise, a mutant has no genetic locus, only a phenotype.

"Homology" versus "similarity."

For use of terms that describe relationships between genes, consult the articles by Theissen (Nature **415**:741, 2002) and Fitch (Trends Genet. **16**:227-231, 2000). "Homology" implies a relationship between genes that have a common evolutionary origin; partial homology is not recognized. When sequence comparisons are discussed, it is more appropriate to use the term "percent sequence similarity" or "percent sequence identity," as appropriate. When using "percent sequence similarity," the method/algorithm used to calculate the percentage should be stated.

Strain designations.

Do not use a genotype as a name (e.g., "subsequent use of *leuC6* for transduction"). If a strain designation has not been chosen, select an appropriate word combination (e.g., "another strain containing the *leuC6* mutation").

"Natural" versus "artificial" transformation.

Natural transformation is a process whereby the recipient cell has the inherent capacity to take up and integrate exogenous DNA into its genome. As such, natural transformation is part of the biology of the recipient cell line and should not be confused with processes through which integration of DNA is forced upon recipient cells.

Viruses.

The genetic nomenclature for viruses differs from that for bacteria. In most instances, viruses have no phenotype, since they have no metabolism outside host cells. Therefore, distinctions between phenotype and genotype cannot be made. Superscripts are used to indicate hybrid genomes. Genetic symbols may be one, two, or three letters. For example, a mutant strain of λ might be designated λ Aam11 *int2* *red*114 *cI*857; this strain carries mutations in genes *cI*, *int*, and *red* and an amber-suppressible (*am*) mutation in gene *A*. A strain designated λ *att*⁴³⁴ *imm*²¹ would represent a hybrid of phage λ that carries the immunity region (*imm*) of phage 21 and the attachment (*att*) region of phage 434. Host DNA insertions into viruses should be delineated by square brackets, and the genetic symbols and designations for such inserted DNA should conform to those used for the host genome. Genetic symbols for phage λ can be found in reports by Szybalski and Szybalski (Gene **7**:217-270, 1979) and Echols and Murialdo (Microbiol. Rev. **42**:577-591, 1978).

Eukaryotes.

For information about the genetic nomenclature of eukaryotes, see the Instructions to Authors for *Eukaryotic Cell* and *Molecular and Cellular Biology*.

Transposable elements, plasmids, and restriction enzymes.

Nomenclature of transposable elements (insertion sequences, transposons, and phage Mu, etc.) should follow the recommendations of Campbell et al. (Gene 5:197-206, 1979), with the modifications given in section vi of "Bacteria," above. The Internet site where insertion sequences of eubacteria and archaea are described and new sequences can be recorded is <http://www-is.biotoul.fr/is.html>.

The system of designating transposon insertions at sites where there are no known loci, e.g., *zef-123::Tn5*, has been described by Chumley et al. (Genetics 91:639-655, 1979). The nomenclature recommendations of Novick et al. (Bacteriol. Rev. 40:168-189, 1976) for plasmids and plasmid-specified activities, of Low (Bacteriol. Rev. 36:587-607, 1972) for F' factors, and of Roberts et al. (Nucleic Acids Res. 31:1805-1812, 2003) for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes should be used when possible. The nomenclature for recombinant DNA molecules constructed in vitro follows the nomenclature for insertions in general. DNA inserted into recombinant DNA molecules should be described by using the gene symbols and conventions for the organism from which the DNA was obtained.

Tetracycline resistance determinants.

The nomenclature for tetracycline resistance determinants is based on the proposal of Levy et al. (Antimicrob. Agents Chemother. 43:1523-1524, 1999). The style for such determinants is, e.g., Tet B; the space helps distinguish the determinant designation from that for phenotypes and proteins (TetB). The above-referenced article shows the correct format for genes, proteins, and determinants in this family.

ABBREVIATIONS AND CONVENTIONS

Verb Tense

ASM strongly recommends that for clarity you use the **past** tense to narrate particular events in the past, including the procedures, observations, and data of the study that you are reporting. Use the present tense for your own general conclusions, the conclusions of previous researchers, and generally accepted facts. Thus, most of the abstract, Materials and Methods, and Results will be in the past tense, and most of the introduction and some of the Discussion will be in the present tense.

Be aware that it may be necessary to vary the tense in a single sentence. For example, it is correct to say "White (30) demonstrated that XYZ cells *grow* at pH 6.8," "Figure 2 shows that ABC cells *failed to grow* at room temperature," and "Air *was removed* from the chamber and the mice *died*, which *proves* that mice *require* air." In reporting statistics and calculations, it is correct to say "The values for the ABC cells *are* statistically significant, indicating that the drug *inhibited*. ... " For an in-depth discussion of tense in scientific writing, see p. 191-193 in *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 6th ed.

Abbreviations

General.

Abbreviations should be used as an aid to the reader rather than as a convenience to the author, and therefore their **use should be limited**. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (*Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 1992) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

It is often possible to use pronouns or to paraphrase a long word after its first use (e.g., "the drug" or "the substrate"). Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, and Leu, etc.) may also be used.

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)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

Not requiring introduction.

In addition to abbreviations for Système International d'Unités (SI) units of measurement, other common units (e.g., bp, kb, and Da), and chemical symbols for the elements, the following should be used without definition in the title, abstract, text, figure legends, and tables: DNA (deoxyribonucleic acid); cDNA (complementary DNA); RNA (ribonucleic acid); cRNA (complementary RNA); RNase (ribonuclease); DNase (deoxyribonuclease); rRNA (ribosomal RNA); mRNA (messenger RNA); tRNA (transfer RNA); AMP, ADP, ATP, dAMP, ddATP, and dGTP, etc. (for the respective 5' phosphates of adenosine and other nucleosides (add 2', 3', or 5' - when needed for contrast); ATPase and dGTPase, etc. (adenosine triphosphatase and deoxyguanosine triphosphatase, etc.); NAD (nicotinamide adenine dinucleotide); NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized); NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced); NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced); NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized); poly(A) and poly(dT), etc. (polyadenylic acid and polydeoxythymidylic acid, etc.); oligo(dT), etc. (oligodeoxythymidylic acid, etc.); UV (ultraviolet); PFU (plaque-forming units); CFU (colony-forming units); MIC (minimal inhibitory concentration); Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]; DEAE (diethylaminoethyl); EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid); EGTA [ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid]; HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid); PCR (polymerase chain reaction); and AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Abbreviations for cell lines (e.g., HeLa) also need not be defined.

The following abbreviations should be used without definition in tables:

amt (amount)
approx (approximately)
avg (average)
concn (concentration)
diam (diameter)
expt (experiment)

exptl (experimental)
 ht (height)
 mo (month)
 mol wt (molecular weight)
 no. (number)
 prepn (preparation)
 SD (standard deviation)
 SE (standard error)
 SEM (standard error of the mean)
 sp act (specific activity)
 sp gr (specific gravity)
 temp (temperature)
 tr (trace)
 vol (volume)
 vs (versus)
 wk (week)
 wt (weight)
 yr (year)

Reporting Numerical Data

Standard metric units are used for reporting length, weight, and volume. For these units and for molarity, use the prefixes m, μ , n, and p for 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , and 10^{-12} , respectively. Likewise, use the prefix k for 10^3 . Avoid compound prefixes such as $\mu\mu$ or $\mu\mu$. Parts per million (ppm) may be used when that is the common measure for the science in that field. Units of temperature are presented as follows: 37°C or 324 K.

When fractions are used to express such units as enzymatic activities, it is preferable to use whole units, such as g or min, in the denominator instead of fractional or multiple units, such as μg or 10 min. For example, "pmol/min" is preferable to "nmol/10 min," and " $\mu\text{mol/g}$ " is preferable to "nmol/ μg ." It is also preferable that an unambiguous form, such as exponential notation, be used; for example, " $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ " is preferable to " $\mu\text{mol/g/min}$." Always report numerical data in the applicable SI units.

Representation of data as accurate to more than two significant figures must be justified by presentation of appropriate statistical analyses.

For a review of some common errors associated with statistical analyses and reports, plus guidelines on how to avoid them, see the article by Olsen (Infect. Immun. **71**:6689-6692, 2003).

For a review of basic statistical considerations for virology experiments, see the article by Richardson and Overbaugh (J. Virol. **79**:669-676, 2005).

Statistics

If biological variation within a treatment (coefficient of variation, the standard deviation divided by the mean) is small (less than 10%) and the difference among treatment means is large (greater than 3 standard deviations), it is not necessary to report statistics. If the data do not meet these criteria, however, the authors must include an appropriate statistical analysis (e.g., Student's *t* test, analysis of variance, or Tukey's test, etc.). Statistics should represent the variation among biological units (e.g., replicate incubations) and not just the variation due to method of analysis.

Phylogenetic trees based on nucleotide or amino acid sequence alignments must be supported by appropriate statistical analyses of tree stability (e.g., bootstrap analysis), and nonsupported branches (e.g., bootstrap coefficients below 50%) should be collapsed. A copy of the alignment should be available for examination by the editor or the reviewers upon request.

For a review of some common errors associated with statistical analyses and reports, plus guidelines on how to avoid them, see the article by Olsen (Infect. Immun. **71**:6689-6692, 2003).

For a review of basic statistical considerations for virology experiments, see the article by Richardson and Overbaugh (J. Virol. **79**:669-676, 2005).

Equations

In mathematical equations, indicate the order of operations clearly by enclosing operations in parentheses, brackets, and braces, in that order: $(a + b) \times c$ or $a + (b \times c)$, $100 \times \{[(a/b) \times c] + d\}$ or $100 \times \{a/[(b \times c) + d]\}$. Italicize variables and constants (but not numerals), and use roman type for designations: E_0 , E_h , M_i , K_m , K_s , $a + 2b = 1.2 \text{ mM}$, $\text{Ca}^{2+} V_{\max} = \exp(1.5x + y)$, $\text{BOD} = 2.7x^2$.

Isotopically Labeled Compounds

For simple molecules, isotopic labeling is indicated in the chemical formula (e.g., $^{14}\text{CO}_2$, $^3\text{H}_2$, and H^{35}SO_4). Brackets are not used when the isotopic symbol is attached to the name of a compound that in its natural state does not contain the element (e.g., ^{32}S -ATP) or to a word that is not a specific chemical name (e.g., ^{131}I -labeled protein, ^{14}C -amino acids, and ^3H -ligands).

For specific chemicals, the symbol for the isotope introduced is placed in brackets directly preceding the part of the name that describes the labeled entity. Note that configuration symbols and modifiers precede the isotopic symbol. The following examples illustrate correct usage.

[¹⁴C]urea
L-[*methyl*-¹⁴C]methionine
[2,3-³H]serine
[*α*-¹⁴C]lysine
[^γ-³²P]ATP
UDP-[U-¹⁴C]glucose
E. coli [³²P]DNA
fructose 1,6-[1-³²P]bisphosphate

AEM follows the same conventions for isotopic labeling as the *Journal of Biological Chemistry*, and more-detailed information can be found in the instructions to authors of that journal (first issue of each year).

FOOTNOTES

* Instructions to Authors are published annually in the January issue. A separate html version, which is updated throughout the year, is at <http://aem.asm.org/misc/ifora.dtl>. 

Applied and Environmental Microbiology, January 2010, p. 1-22, Vol. 76, No. 1
0099-2240/10/\$12.00+0 doi:10.1128/AEM.02309-09

Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved