



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**ROSILEIDE FONTENELE DA SILVA ANDRADE**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO  
DE BIOSURFACTANTES DE *Candida lipolytica* e  
*C. glabrata* UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS  
COMO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

**Recife**

**2010**

**ROSILEIDE FONTENELE DA SILVA ANDRADE**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO  
DE BIOSSURFACTANTES DE *Candida lipolytica* e  
*C. glabrata* UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS  
COMO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

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

**Área de Concentração:** Desenvolvimento de Processos Ambientais.

**Linha de Pesquisa:** Tecnologia e Meio Ambiente.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki

**Co-orientadora :** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana de Oliveira Franco

**Recife**

2010

A553p

Andrade, Rosileide Fontenele da Silva

Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes de *Candida lipolytica* e *C. glabrata* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos / Rosileide Fontenele da Silva Andrade ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Luciana de Oliveira Franco, 2010.

xvi, 109, [22] f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2010.

1. Resíduos industriais. 2. Biossurfactantes. 3 *Candida lipolytica*.

I. Título.

CDU 574.6

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES  
DE *Candida lipolytica* e *C. glabrata* UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS  
COMO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

**Rosileide Fontenele da Silva Andrade**

**Examinadores:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thayza Christina M. Stamford  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB/PB

---

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Defendida em: 8 de fevereiro de 2010

**DEDICO à Deus por ter permitido alcançar mais esta etapa na minha vida, à minha família pelo apóio e incentivo e a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Galba Takaki pelo exemplo e validosos ensinamentos.**

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.  
A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes”.*

*Cora Coralina*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela constante presença em minha vida e pelo fortalecimento em todos os momentos;

Aos meus pais Maria José da Silva e Francisco Rômulo Fontenele de Andrade pela credibilidade e pelo amor e carinho recebidos sempre;

Á meu irmão Alberto Andrade pelo incentivo, e em especial a minha irmã Rosangela Fontenele da Silva Andrade pelo companherismo, paciência e compreensão em todos os momentos, a meu cunhado Cláudio Luiz pelo apóio e aos meus sobrinhos Ana Clara, Gabriel Fontenele, Isabelle Barbosa pela constante presença em todos os momentos da minha vida;

Á Profª Drª Galba Takaki, orientadora deste trabalho, pela valiosa oportunidade que me concedeu, ao me aceitar como aluna desde minha graduação, muito contribuindo para meu aperfeiçoamento profissional. É na qualidade de sua orientanda que quero expressar o meu mais sincero agradecimento a ela que, mostrou-me sempre com toda a delicadeza que lhe é peculiar, minhas fraquezas e como superá-las, respeitando o meu estilo de pesquisa e autoria e destacando os meus saberes e competências. Agradeço ainda pelas condições de trabalho que me proporcionou, pela disponibilidade demonstrada, pela paciência com que combateu meu pessimismo em algumas etapas do trabalho e, sobretudo, pela amizade em todos os momentos;

A Profª Drª Luciana Franco, co-orientadora deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, com inteligência e generosidade;

Á Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação;

Ao Prof Dr Marcos Lima pelo apóio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Cíntia Rodrigues, Luiz Queiroz, Francisco Araújo, Ridelson Tavares, Selma Neide, Ormiro Joaquim, e em especial a Roberto Lima pelo companherismo e a Adamares Marques pela amizade, construídos durante o curso e que nunca serão esquecidos;

À Profª Drª Maria Resende e todos seus alunos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela colaboração para identificação da levedura utilizada neste trabalho;

À Drª Maria Luiza Ribeiro Blastos da Silva pelas contribuições prestadas para identificação molecular da levedura isolada;

À todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela atenção e apóio, em especial a minha grande amiga Hέλvia Casullo pelos bons momentos convividos, a Adriana Antunes e a Kamylla Alexandre pela participação relevante nesta pesquisa;

À Profª Drª Clarissa Daisy Albuquerque pelas contribuições prestadas para execução deste trabalho;

Ao professor Dr. Valdemir Alexandre pelo apóio e conhecimentos transmitidos para validação estatística dos resultados;

Ao Prof. Dr. Nelson Durán e ao técnico Francisco do Laboratório de Química do Instituto de Química da UNICAMP, pelo apoio e ensinamentos;

Aos Professores Dr. Elias Tambourgi e Flávio Vasconcelos pelo apoio dado na UNICAMP;

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco em especial a Cláudio Roberto e Cristiano pelo carinho e incentivo;

Aos Professores do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais Profª. Drª . Alexandra Amorim Salgueiro, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Profª. Drª. Kaoru



Okada, Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos e Profa. Dr<sup>a</sup>. Eliane Cardoso Vasconcelos pelos ensinamentos;

Aos funcionários Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo e técnicos André Felipe, Severino Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim (in memória) que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

À Fundação de Ampara à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto não poderia ser realizado.

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para realização do intercâmbio com a UNICAMP;

À todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

<b>Figura 1</b> - Localização de Serra - Talhada em Pernambuco	22
<b>Figura 2</b> - <i>Candida glabrata</i>	24
<b>Figura 3</b> - <i>Candida lipolytica</i>	25
<b>Figura 4</b> - Monômero surfactante	26
<b>Figura 5</b> - Tensões superficiais dos líquidos	28
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática da atuação do surfactante	29
<b>Figura 7</b> - Esquema do comportamento do surfactante entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC	30
<b>Figura 8</b> - Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípido (A e B) e lipopeptídeo (C).	31
<b>Figura 09</b> – Etapas do processo de fabricação do queijo	39

### Capítulo 2

<b>Figura 1</b> Pareto Chart of standardized effects for surface tension of the cell-free broth from <i>C. lipolytica</i> after 96 hours of cultivation for the 2 <sup>3</sup> full factorial design. The point at which the effect estimates were statistically significant (at p = 0.05) is indicated by the broken vertical line	54
<b>Figura 2</b> Effect of temperature on the emulsification index of corn oil by the cell-free broth of <i>C. lipolytica</i> grown in medium containing 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea during 96 h	55
<b>Figura 3</b> Effect of pH on the emulsification index of corn oil by the cell-free broth of <i>C. lipolytica</i> grown in medium containing 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea during 96 h	55
<b>Figura 4</b> Effect of NaCl addition on the emulsification index of corn oil by the cell-free broth of <i>C. lipolytica</i> grown in medium containing 10%	56

cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea during 96 h

### Capítulo 3

- Figura 1-** Identificação através de métodos morfológicos e bioquímicos de *Candida glabrata* isolada do solo do semi-árido-PE: (A) Identificação morfológica macroscópica; (B) Identificação morfológica microscópica em ágar fubá; (C) Assimilação de fontes nitrogenadas e (D) Fermentação de açúcares 87
- Figura 2-** Eletroforese em gel de agarose após Reação de cadeia Polimerase PCR: (A) Amplificação do DNA de *Candida glabrata* utilizando Primes ITS1 e ITS2 e (B) Purificação do DNA 88
- Figura 3-** Curva de crescimento e tensão superficial do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* isolada de solo semi-árido, PE, em meio de produção constituído por rejeitos industriais milhocina e soro de leite após 72 horas de fermentação 89
- Figura 4-** Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* após 72 horas de cultivo em meio composto por rejeitos industriais 90
- Figura 5-** Comprovação da produção extracelular do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* através da tensão superficial do líquido metabólico, da condição selecionada do planejamento, em diferentes condições: LS1 (líquido metabólico com células de *C. glabrata*), LS2 (líquido metabólico livre de células), LS3 (líquido metabólico após extração do biossurfactante) e LS4 (controle). 91
- Figura 6 -** Estabilidade do biossurfactante determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida glabrata*: (A) diferentes valores de pH; (B) diferentes concentrações de NaCl e (C) diferentes temperaturas. 92
- Figura 7 -** Espectrometria no infravermelho (IV) com transformação Fourier (FT-IR) do biossurfactante produzido por *C. glabrata* 93

<b>Figura 8-</b> Gráfico de superfície para variável resposta tensão superficial em função das diferentes concentrações de soro de leite e milhocina	94
<b>Figura 9-</b> Curvas de contorno para variável resposta tensão superficial em função das diferentes concentrações de soro de leite e milhocina	95
<b>Figura 10-</b> Valores previstos em função dos observados relativos à tensão superficial do biossurfactante produzido por <i>Candida glabrata</i> com 72 horas de cultivo	96
<b>Figura 11 -</b> Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por <i>Candida glabrata</i> com 72 horas de cultivo	97

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos	27
<b>Tabela 2-</b> Potencial de aplicações dos biossurfactantes	34
<b>Tabela 3-</b> Utilização de matéria-prima de baixo custo para produção de biossurfactante	35
<b>Tabela 4-</b> Composição Média da Manipueira	37
<b>Tabela 05-</b> Composição típica do leite e do soro de leite	40
<b>Tabela 6-</b> Composição de Aminoácidos, Vitaminas e Minerais encontrados em uma Solução Concentrada de Milhocina	41

### Capítulo 2

<b>Table 1-</b> Surface tension, emulsification index and emulsification activity values obtained in the $2^3$ full factorial design used for biosurfactant production by <i>C. lipolytica</i> grown in Yeast Water Medium during 96 hours. Numbers one (1) to eight (8) are the runs corresponding to the experimental conditions obtained from the combination of the variables tested and numbers nine (9) to ten (12) are the runs corresponding to the experimental conditions of the central point	54
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Capítulo 3

<b>Tabela 1-</b> Níveis e fatores do DCCR aplicado	84
<b>Tabela 2-</b> Matriz do planejamento codificada para o DCCR aplicado do planejamento experimental de $2^2$	84
<b>Tabela 3</b> - Resultados do processo fermentativo de <i>Candida glabrata</i> utilizando planejamento fatorial de $2^2$ com 4 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo, tendo como variável resposta a tensão	85

superficial e índice de emulsificação

**Tabela 4-** Análise da variância dos dados experimentais para a tensão superficial 86

## RESUMO

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos produzidos por microrganismos com várias e importantes aplicações industriais e ambientais, cujos metabólitos vem sendo investigado, principalmente pelas vantagens de biodegradabilidade, produção a partir de fontes renováveis e funcionalidade sob condições extremas. Entretanto, seu uso depende do custo de produção e purificação, sendo comparados aos surfactantes sintéticos. Deste modo, neste trabalho foi estudada a utilização de meios constituídos por rejeitos industriais (manipueira, milhocina e soro de leite) como alternativa de baixo custo na produção de biossurfactantes pelas linhagens do Gênero *Candida*. Os estudos foram realizados, inicialmente com a linhagem de *Candida lipolytica*, mantida no banco de culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da UNICAP, visando estabelecer a formulação de um novo meio de produção de biossurfactante utilizando manipueira como substrato de acordo com planejamento fatorial de  $2^3$ . Os resultados demonstraram a redução da tensão superficial da água de 72mN/m para 26,35mN/m pelo biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*, em meio formulado com 10% da manipueira, 0,2% do sulfato de amônio e 0,1% da uréia após 96 horas de cultivo. O biossurfactante produzido foi caracterizado como polimérico devido a alta composição em carboidratos, proteínas e lipídeos, além de apresentar alta estabilidade em ampla faixa de temperaturas, demonstrando eficiência em processos de biorremediação removendo 81,7% do óleo queimado de motor presente em solo. As investigações foram continuadas por uma linhagem selvagem de *Candida glabrata*, isolada de solo do semi-árido, PE, Brasil. A levedura isolada foi identificada pela morfologia, por testes bioquímicos e moleculares como *C. glabrata*, demonstrando potencial de produção do biossurfactante, utilizando um planejamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), empregando os resíduos industriais milhocina e soro de leite, havendo significativa redução da tensão superficial da água de 72 para 28, 53mN/m. O biossurfactante isolado produzido por *C. glabrata*, foi caracterizado como polimérico devido à alta composição em lipídeos, proteínas e carboidratos demonstrando ser estável em altas concentrações de

cloreto de sódio, além de remover 95% do óleo queimado de motor em solo arenoso. Devido o potencial de redução da tensão superficial por *C. lipolytica* e *C. glabrata*, o processo de produção destes biossurfactantes tornam-se economicamente viáveis devido a utilização de rejeitos industriais para obtenção destes biopolímeros, tornando o processo econômico com grande potencialidade de aplicação em processos ambientais.

**Palavras-chaves:** *Candida*. Biossurfactante. Resíduos industriais.



## ABSTRACT

The biosurfactants are amphipathic compounds produced by microorganisms with several important environmental and industrial applications, whose metabolites has been investigated, mainly by the advantages of biodegradability, production from renewable resources and functionality under extreme conditions. However, its use depends on the cost of production and purification, and compared to synthetic surfactants. Thus, in this work the use of resources consisting of industrial waste (Manipueira, corn steep liquor and whey) as low-cost alternative in the production of biosurfactants by the strains of the genus *Candida*. The studies were carried out initially with the strain of *Candida lipolytica*, maintained in the cultures of the Center for Research in Environmental Science UNICAP, to establish the formulation of a new medium for biosurfactant production using cassava wastewater as substrate according to factorial design 23. The results showed a reduction in surface tension of water 72mN / m to 26.35 mN / m by the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in medium formulated with 10% of Manipueira, 0.2% of ammonium sulfate and 0.1% of urea after 96 hours of culture. The biosurfactant produced was characterized as polymer composition due to high in carbohydrates, proteins and lipids, and shows high stability in a wide range of temperatures, showing efficiency in bioremediation processes by removing 81.7% of burnt motor oil is present in soil. The investigations were continued by a wild strain of *Candida glabrata*, isolated from soil in semi-arid, PE, Brazil. The isolated yeast was identified by morphology, by biochemical and molecular as *C. glabrata*, demonstrating the potential of producing biosurfactant using an experimental design type DCCR (central composite rotational design), using industrial waste corn steep liquor and whey, with significant reduction in surface tension of water from 72 to 28.53mN / m The isolated biosurfactant produced by *C. glabrata*, was described as due to high polymeric composition of lipids, proteins and carbohydrates demonstrating stable in high concentrations of sodium chloride, and remove 95% of burned motor oil in sandy soil. Because of the potential reduction of surface tension by *C. lipolytica* and *C. glabrata*, the process of production of these biosurfactants become economically viable due to the use of industrial

waste to obtain these biopolymers, making the economic process with great potential for application in environmental processes.

**Keywords:** *Candida*. Biosurfactant. Industrial waste.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b>	22
<b>1.1 Introdução</b>	23
<b>1.2 Objetivos</b>	25
<b>1.2.1 Objetivo Geral</b>	25
<b>1.2.2 Objetivos Específicos</b>	25
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	26
1.3.1 Semi-árido	26
1.3.2 Isolamento e Identificação de leveduras	27
1.3.3 Aspectos gerais: <i>Candida</i> sp	28
1.3.3.1 <i>Candida glabrata</i> e <i>C lipolytica</i>	29
1.3.4 Surfactantes	30
1.3.4.1 Biossurfactantes	31
1.3.4.2 Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores	36
1.3.4.3 Propriedades dos biossurfactantes	37
1.3.4.4 Funções fisiológicas dos biossurfactantes	37
1.3.4.5 Potencial de aplicação dos biossurfactantes	38
1.3.4.6 Vantagens de utilização dos biossurfactantes	40
1.3.5 Rejeitos industriais	40
1.3.5.1 Manipueira	41
1.3.5.2 Soro de leite	42
1.3.5.3 Milhocina	44
<b>1.4 Referências Bibliográficas</b>	45
	52
	53

## CAPÍTULO 2

**Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate**

## CAPÍTULO 3 60

**Isolamento e Identificação de *Candida glabrata*, em solos do semi-árido (PE), para produção de biossurfactante utilizando resíduo industrial como meio de baixo custo** 61

**3.1 RESUMO** 63

**3.2 ABSTRACT** 64

**3.3 INTRODUÇÃO** 65

**3.4 MATERIAL E MÉTODOS** 68

3.4.1 Solo 68

3.4.2 Microrganismo 68

3.4.3 Substratos 68

3.4.4 Planejamento fatorial 68

3.4.5 Isolamento das leveduras 69

3.4.6 Identificação e caracterização morfológica, bioquímica e molecular da levedura isolada 69

3.4.6.1 Microcultivo 69

3.4.6.2 Zimograma 70

3.4.6.3 Assimilação de nitrogênio 70

3.4.6.4 Reação em Cadeia Polimerase - PCR 71

3.4.6.5 Extração do DNA 71

3.4.6.6 Quantificação do DNA genômico 71

3.4.6.7 Amplificação da região ITS 2 72

3.4.6.8 Seqüenciamento e Análise dos dados 72

3.4.7 Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* 73

3.4.7.1 Pré-inóculo 73

3.4.7.2 Fermentação submersa 73

3.4.7.3 Cinética de crescimento	73
3.4.7.4 Determinação da estabilidade	73
3.4.7.5 Determinação do pH	74
3.4.7.6 Determinação da tensão superficial	74
3.4.7.7 Determinação do índice de emulsificação	74
3.4.7.8 Determinação da atividade de emulsificação	74
3.4.8 Isolamento e caracterização do biossurfactante	75
3.4.8.1 Extração	75
3.4.8.2 Carga iônica	75
3.4.8.3 Composição química	76
3.4.8.4 Espectrometria ao raio do infravermelho	76
3.4.8.5 Teste de toxicidade	76
3.4.9 Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo	76
<b>3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
3.5.1 Identificação e caracterização de <i>Candida glabrata</i> isolada de solos de Serra-talhada (PE)	77
3.5.2 Produção e caracterização do biossurfactantes produzido por <i>Candida glabrata</i> UCP (1556)	78
3.5.2.1 Produção extracelular do biossurfactante	78
3.5.2.2 Influência da fonte de carbono e nitrogênio	79
3.5.2.3 Propriedades emulsificantes do biossurfactante de <i>Candida glabrata</i>	80
3.5.2.4 Estabilidade do biossurfactante produzido por <i>Candida glabrata</i>	81
3.5.2.5 Composição química do biossurfactante selecionado	82
3.5.2.6 Carga iônica do biossurfactante	82
3.5.2.7 Caracterização por espectrometria no infravermelho	83
3.5.2.8 Toxicidade do biossurfactante	83
3.5.2.9 Validação estatística dos resultados da produção do biossurfactante por <i>Candida glabrata</i> UCP 1556	83
3.5.3 Aplicação do biossurfactante isolado na remoção de óleo queimado de motor em solo arenoso	84

<b>3.6 AGRADECIMENTOS</b>	85
<b>3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	86
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	107

# Capítulo I

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são ubíquos na natureza, podendo ser encontrados em regiões úmidas ou desérticas, em água doce ou salgada, desde solo superficial a qualquer profundidade, no ar, em ambientes domésticos ou industriais, em altas ou baixas temperaturas, em ambientes poluídos ou não, além de apresentarem uma imensa diversidade genética, desempenhando funções únicas e importantes no funcionamento dos ecossistemas (MARÇAL, 2005).

O solo é considerado um ecossistema complexo e dinâmico, e suas atividades estão interligadas entre si e com as condições do ambiente prevalecentes a cada momento, verificando-se que a população microbiana se ajusta rapidamente às variações dessas condições ambientais. Neste contexto, os fungos apresentam extraordinária importância, uma vez que possuem imensa diversidade biológica no mundo estimada em 1,5 milhões de espécies, das quais menos de 5% foram identificados. Devendo-se levar em consideração que grande parte desta diversidade encontra-se predominantemente em países tropicais, dentre os quais, o Brasil é o maior reservatório (TURCO e BLUME, 1999).

As leveduras são fungos unicelulares usualmente arredondados que se reproduzem por brotamento, originando blastoporos e dentre este grupo de organismos, as espécies do Gênero *Candida* têm sido bastante estudada e empregada na produção de biossurfactantes por não apresentarem risco de toxicidade (KIM, et. al., 2006; FONTES, et.al., 2008).

Como em qualquer região semi-árida do mundo, o Nordeste brasileiro sempre estará sujeito às secas periódicas devido à irregularidade das chuvas e a má distribuição geográfica das mesmas. Além disso, outros fatores como a capacidade de reter a umidade no solo e altas taxas de evapotranspiração contribuem para agravar o problema (GALVÍNCIO e MOURA, 2005).

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos, de origem microbiana, excretados extracelularmente, que possuem em sua estrutura uma região hidrofóbica e outra hidrofílica capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, cuja utilização tem recebido grande interesse devido as características que os tornam vantajosos frente aos surfactantes químicos. Dentre estas estão a baixa toxicidade, biodegradabilidade e a síntese a partir de material renovável e de baixo custo (CERQUEIRA e COSTA, 2009).



O semi-árido brasileiro não é um mero segmento de um cinturão zonal de áreas semi-áridas tropicais ou subtropicais, tratando-se de um dos raros exemplos de domínios morfoclimáticos intertropicais secos. Em seus limites extremos, o semi-árido Nordeste faz transições para faixas de climas sub-úmidos, que o envolve pela maior parte de seus quadrantes. Admite-se assim, que a caatinga brasileira não é resultado da degradação antrópica, como em outras regiões do mundo, podendo-se atribuir ao homem, apenas o mau uso dos recursos naturais para ocupação e sobrevivência neste ambiente do Brasil. Esta Região abriga o município de Serra-Talhada, localizado no sertão Pernambucano, o qual possui 2.959 km<sup>2</sup> e dista 418 km do Recife, capital do Estado. O clima é semi-árido com temperatura média anual de 25,9°C e precipitação média anual de 887,9 mm (SUASSUNA,1994).

A biodiversidade da região semi-árida é extremamente complexa e acredita-se que em condições nutricionais e climáticas extremas, como as que ocorrem nesta região, os microrganismos encontrados apresentem características bioquímicas e fisiológicas de interesse biotecnológico, dentre estas, a produção de substâncias bioativas. Neste sentido, o presente trabalho visou o conhecimento do potencial biotecnológico na produção de biossurfactantes por linhagem de *Candida lipolytica*, pertencente ao banco de culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da UNICAP, e *C. glabrata*, linhagem selvagem, isolada de solos do semi-árido do estado de Pernambuco (Brasil), utilizando meio de cultivo de produção economicamente viável composto por rejeitos industriais.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* e *C. glabrata* (isolada do semi-árido-PE) na produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes, utilizando meio de baixo custo, tendo como base rejeitos industriais, através de um planejamento fatorial completo.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar leveduras do Gênero *Candida* em solos do semi-árido;
- Realizar a caracterização morfológica e bioquímica da levedura isolada;
- Realizar a cinética da produção dos biossurfactantes por *Candida lipolytica* e *C. glabrata* utilizando como substratos manipueira, soro de leite e milhocina, de acordo com um planejamento fatorial;
- Selecionar as melhores condições e realizar a otimização da produção de biossurfactantes através de planejamento fatorial completo;
- Avaliar a estabilidade dos biossurfactantes produzidos utilizando diferentes níveis de pH, salinidade e temperatura;
- Realizar o isolamento e a caracterização química dos biossurfactantes;
- Avaliar a eficiência dos biossurfactantes produzidos através da remoção do óleo de motor queimado adsorvido em solo;
- Realizar a validação dos resultados obtidos.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 Semi-árido

O semi-árido brasileiro é um dos maiores e mais populosos do mundo. Estende-se por 868 mil quilômetros, abrangendo o Norte dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, os sertões da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e uma parte do Sudeste do Maranhão. Caracteriza-se por apresentar precipitações concentradas em curto período de tempo, de forma que à maior parte do ano os solos são expostos a forte insolação e ao elevado déficit hídrico. Por outro lado, a variação estacional do clima afeta o conteúdo de água do solo e como consequência a atividade biológica (GALVÍNCIO e MOURA, 2005; ARAÚJO et al., 2008).

O Estado de Pernambuco tem a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística variada, denominada “caatinga” que atualmente é considerado um bioma único de alta complexidade e caráter extremamente heterogêneo. O Sertão do estado é uma região semi-árida, com temperaturas elevadas e baixa pluviosidade onde as práticas de desmatamento, para implantação de culturas ou pecuária extensiva, têm acarretado alterações na microbiota edáfica, antes mesmo destas serem estudadas. (GALVÍNCIO e MOURA, 2005).

O município de Serra-Talhada apresenta temperatura anual média entre 25,9°C para mínima e de 37°C para médias máximas com precipitação média anual de 887,9 mm. O solo apresenta-se como argissolos, latossolos, luvisolos e neossolos (EMBRAPA, 1999).

A Caatinga encontra-se hoje em acentuado processo de desertificação ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais o que ressalta a necessidade de estudos acerca da biodiversidade, destacando as comunidades microbianas e os processos por elas desencadeados, não apenas para se conhecer os indivíduos e respectivas funções, mas também os efeitos dos distúrbios ou estresses ambientais sobre tais comunidades (DRUMOND et al., 2000).

## SERTÃO



**Figura 1-** Localização de Serra - Talhada em Pernambuco, Brasil

### 1.3.2 Isolamento e Identificação de leveduras

O primeiro sistema de identificação de leveduras foi descrito em 1896, descrevendo suas características morfológicas e fisiológicas, colaborando para identificação de várias espécies (MARÇAL, 2005).

As leveduras são tradicionalmente caracterizadas, classificadas e identificadas através de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais, os quais são importantes na determinação genética. Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono e assimilação de nitrogênio são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de utilização desses compostos (CLAUDINO, 2007).

Os métodos utilizados tradicionalmente para identificação de leveduras ainda geram resultados duvidosos, uma vez que as características fisiológicas são influenciadas pelas condições da cultura (YAMAMOTO et al., 1991).

Métodos de identificação, com base em técnicas de biologia molecular, têm colaborado significativamente para a caracterização genética das espécies. O método de PCR (Polymerase Chain Reaction) descrita por Kary Mullis em meados da década de 80 tem sido apontado como sendo a ferramenta mais satisfatória para uma rápida identificação de leveduras permitindo avanços significativos na organização

taxonômica destes indivíduos, principalmente quando aliada ao seqüenciamento de nucleotídeos e a amplificação do DNA com primers randômicos (análise de RAPD) (GRANCHI, et al., 1999; MARÇAL, 2005).

Os genes ribossomais de leveduras são organizados em “tandem”, repetindo-se centena de vezes, sendo que cada unidade de repetição inclui 3 genes: rDNA 18S, 5,8S e 28S. Estes genes são separados por dois espaços internos transcritos: ITS1 e ITS2, que separam as regiões conservadas 18S, 26S e 5,8S. Estas regiões, ITS1 e ITS2 são menos conservadas, pois evoluem rapidamente, passando a serem usadas para discriminação de espécies (MARÇAL, 2005).

Granchi et al. (1999), fizeram um estudo comparativo utilizando métodos tradicionais e a metodologia molecular (PCR-RFLP) analisando a região ITS de rDNA com linhagens de leveduras. Ambos os procedimentos apresentaram os mesmos resultados, porém, a análise de PCR - RFLP permitiu uma descrição mais precisa das populações, de leveduras, provando ser um método seguro e simples.

### 1.3.3 Aspectos gerais: *Candida sp*

O Gênero *Candida* compreende um grupo de fungos leveduriformes que podem ser encontrados em diversos ecossistemas como rios e solos, e em casos especiais, em seres humanos e animais. As espécies deste Gênero compreendem organismos eucariotos, não fotossintéticos, constituídos por organelas citoplasmáticas, parede celular, e uma membrana plasmática rica em esteróis, principalmente o ergosterol (KUTZMAN e FELL, 2000; AKPAN e MORGAN, 2002; BARROS, 2005).

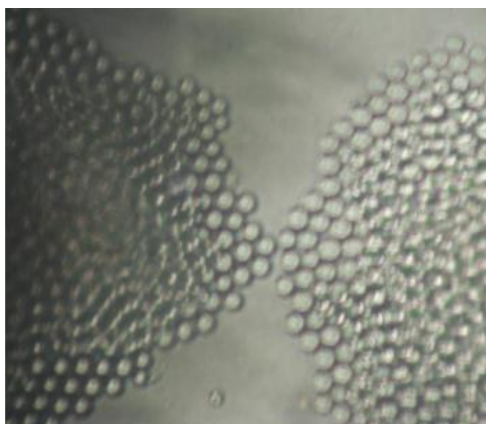
Geralmente, as espécies de *Candida* são dimórficos, podendo aparecer microscopicamente na forma de levedura apresentando células ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 à 7 µm de largura por 3 à 14 µm de comprimento, na forma de micélio apresentam-se sob a forma de pseudohifas ou podem formar hifas verdadeiras. Apresentam como características colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada (KUTZMAN e FELL, 2000; RODRIGUES, 2006).

As espécies de *Candida* podem viver como sapróbias, comensais ou parasitas patogênicos aos humanos e animais. Entre elas podemos destacar *C. albicans*, *C. catenulada*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. stelatoidea*, *C. viswanathii*, *C. Tropicalis* e *C. zeylanoides*. Um pequeno número delas é responsável pela maioria das infecções em humanos, pois em indivíduos imunologicamente

saudáveis, os mecanismos de defesa do hospedeiro são suficientes para prevenir infecções por *Candida* (LYNCH, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996; PEREIRA, 2002).

### 1.3.3.1 *Candida glabrata* e *Candida lipolytica*

*Candida glabrata* é uma espécie de fungo leveduriforme haplóide. Dentre as espécies de *Candida*, esta levedura é a única que não apresenta em sua estrutura pseudo-filamentos. Apresenta como característica macroscópica, uma coloração opaca, de branco a creme, consistência cremosa e lisa possuindo em sua estrutura microscópica apenas os blastoconídeos (Figura 2). Esta levedura classifica-se como pertencente ao Phylum Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Candida* e Espécie *glabrata* (KUTZMAN e FELL, 2000).



**Figura 2 - *Candida glabrata***

*Candida lipolytica* é fungo leveduriforme que apresenta como característica macroscópica uma coloração opaca, de branca a creme, consistência cremosa e formato cerebriforme. Em sua morfologia microscópica observa-se pseudohifas e raros blastoconídeos de ramificações alongada (ALEXOPOULOS et al., 1996; HOSPENTHAL et.al., 2006). É uma levedura pertencente ao Phylum Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero e Espécie *Candida lipolytica* (KUTZMAN e FELL, 2000)



**Figura 3 - *Candida lipolytica***

Devido à grande versatilidade metabólica, as leveduras apresentam alto potencial em diversas aplicações biotecnológicas, com comprovada capacidade de produção de uma ampla variedade de substâncias bioativas, incluindo enzimas e outros metabólitos que desempenham importante papel ecológico. Dentre estes compostos estão os biossurfactantes (PAREILLEUX, 1979).

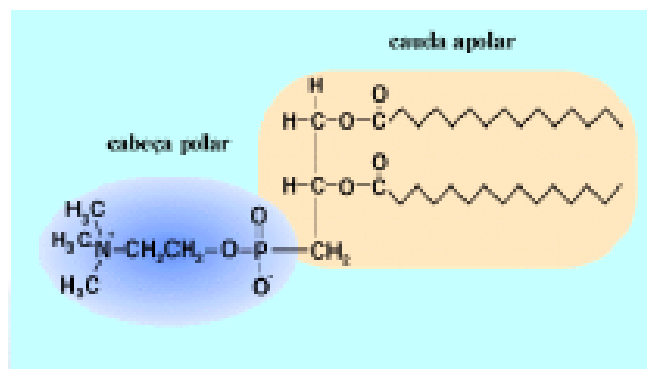
Uma linhagem de *Candida apícola* foi estudada por Hommel e Huse (1993). Estes autores descreveram a habilidade desta levedura na produção de biossurfactante do tipo glicolípido a partir de glicose, frutose e sacarose.

Estudos realizados por Ciriglino e Carman (1985) demonstraram a habilidade da *Candida lipolytica* em produzir bioemulsificantes em meio composto por n-hexadecano.

De acordo com Osamu (2002), várias espécies de leveduras do Gênero *Candida* têm sido utilizadas como produtoras de agentes surfactantes.

#### **1.3.4 Surfactantes**

São moléculas que possuem ação superficial devido às suas características anfifílicas, ou seja, presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos numa mesma molécula (Figura 3), apresentando a capacidade de atuar na interface de compostos de diferentes naturezas (CERQUEIRA e COSTA, 2009).



**Figura 4 - Monômero surfactante**

Fonte: [http:// www.virtuallaboratory.ne](http://www.virtuallaboratory.ne)

Os surfactantes possuem diversos tipos de aplicações como: emulsificação, detergência, solubilização e umidificação. O mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano (CERQUEIRA e COSTA, 2009).

Quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo. Entretanto, o interesse por surfactantes biológicos tem aumentado nos últimos anos, devido às suas inúmeras características: possibilidade de produção através de fermentações, potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde, indústrias de processamento de alimentos (CASTIGLIONE e CARMAN, 2009).

Novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa em substituição aos sintéticos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Nesse contexto, destacam-se os metabólitos produzidos por microrganismos, os chamados biossurfactantes (HABA et al., 2000).

#### 1.3.4.1 Biossurfactantes

Vários seres vivos produzem biossurfactantes, tais como os animais, as plantas e os microrganismos. A produção microbiológica de biossurfactantes é considerada mais promissora devido ao curto tempo de geração quando comparados ao crescimento de plantas e animais. O tipo de biossurfactante é muito específico



podendo variar de espécie para espécie (Tabela 1) (LANG, 2002; MUTHUSAMY et.al., 2008).

**Tabela 1.** Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos

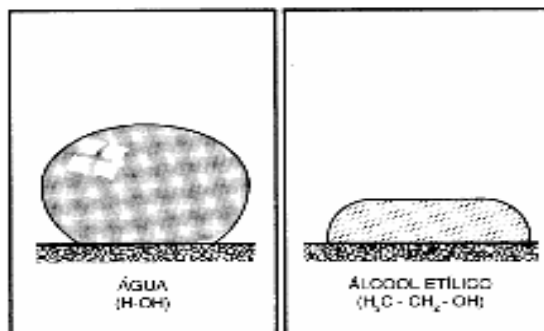
MICROORGANISMOS	CLASSE DE BIOSSURFACTANTES
<i>Candida lipolytica</i>	Liposan
<i>Candida petrophilium</i>	Peptídolípeo
<i>Candida tropicalis</i>	Complexo ácido graxo-polissacarídeo
<i>Candida glabrata</i>	Soforolípeo
<i>Trolulopsis petrophilium</i>	Glicolípeo e/ou proteína
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Lipoheteropolissacarídeo (emulsan)
<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N	Ácidos graxos, mono e diglicerídeos
<i>Arthobacter</i>	Glicolípeo
<i>Arthobacter paraffineus</i>	Glicolípeos sacarose e frutose
<i>Bacillus licheniformes</i>	Lipoproteína (lichenysin)
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	Lípido neutro
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lípídeos neutros
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolípeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeos
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Fosfolípido
<i>Aspergillus sp.</i>	Fosfolípido
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactina
<i>Flavobacterium sp.</i>	Flavolípeos

Fonte: LANG, 2002; MUTHUSAMY et.al., 2008

Os biossurfactantes foram descobertos na década de 60, como compostos extracelulares anfipáticos. Todos biossurfactantes apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Devido a essa natureza anfipática, os surfactantes se acumulam na interface ar-água e óleo-água e superfície (MUTHUSAMY et.al., 2008).

Os biossurfactantes são capazes de reduzir as forças de repulsão entre fases diferentes, interface ou superfície, e permitem que as duas fases se misturem mais facilmente. Assim sendo, quanto menor a força de atração existente entre as moléculas do líquido menor será a tensão superficial ocorrendo menor viscosidade e

maior tendência a espalhar-se. Na Figura 4, observa-se que o etanol possui menor tensão superficial por possuir maior tendência a espalhar-se no líquido (DEL PINO e NETO, 1996).



**Figura 5 - Tensões superficiais dos líquidos**

Fonte: DEL PINO e NETO, 1996

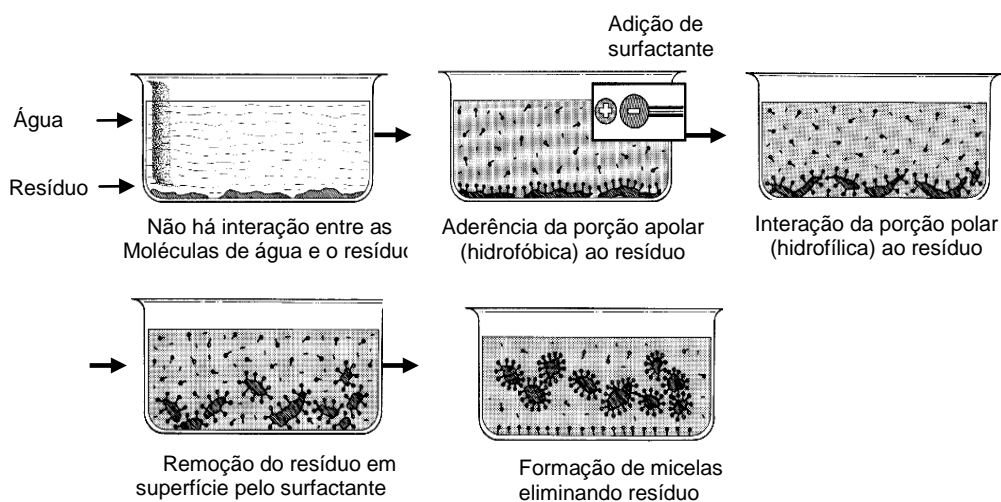
Dessa forma, os biossurfactantes são definidos como compostos microbianos que apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos com diferentes graus de polaridade (COSTA, et. al., 2008).

A determinação da tensão superficial é uma análise qualitativa, que permite avaliar a produção de tensoativos através da medida da redução da tensão superficial em relação a tensão da água (70mN/m). De acordo com a literatura as tensões nas faixas de 35mN/m a 40mN/m, indicam que o microrganismo é promissor na produção de biossurfactantes e abaixo de 35mN/m, indica que o microrganismo pode ser considerado um eficiente produtor (SILVA, 2002).

De acordo com Lima et. al. (2007), os biossurfactantes podem apresentar baixo ou alto peso molecular. Os que possuem baixo peso molecular são considerados mais eficientes quanto à redução da tensão superficial, e os de alto peso molecular demonstram maior eficiência em estabilizar emulsões entre líquidos com diferentes graus de polaridade.

Estes compostos tensoativos, os biossurfactantes, possuem características importantes frente aos surfactantes sintéticos, tais como a alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, resistência a altas concentrações salinas e estabilidade quanto a variações de pH. Muitos surfactantes sintéticos causam problemas ecológicos devido a sua resistência à degradação, toxicidade e o acúmulo em ecossistemas naturais (SILVA, 2002; CERQUEIRA e COSTA, 2009).

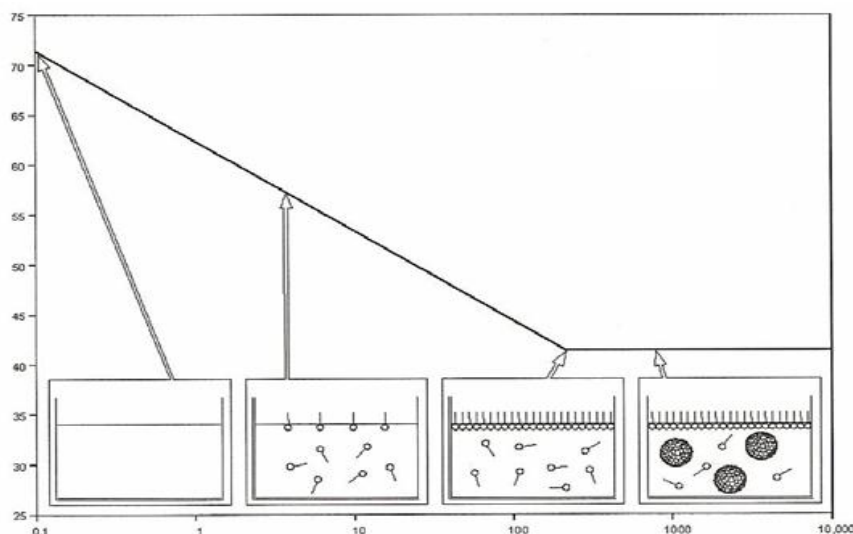
Em função de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se localizarem nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água, água/óleo) (LIMA et. al., 2007). A adsorção à superfície de líquidos e a formação de micelas deve-se a solubilidade dos biossurfactantes (Figura5) (DEL PINO e NETO, 1996).



**Figura 6-** Representação esquemática da atuação do surfactante

Fonte: DEL PINO e NETO (1996), modificado pela autora

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). Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma monomérica. Desta forma, a intensidade de adsorção do biossurfactante à superfície depende de sua concentração (Figura 6), ocasionando uma variação na ordenação destas moléculas sobre a superfície. Em concentrações muito baixas de biossurfactantes, o mesmo se distribui na superfície e tende a se orientar paralelamente a esta. Quando ocorre um aumento da concentração de biossurfactante, observa-se uma diminuição da área disponível para as moléculas iniciando o processo de ordenação das mesmas à superfície (SANTOS et.al., 2007).



Fonte: SANTOS, et. al., 2007

**Figura 7-** Esquema do comportamento do surfactante entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC

Os biossurfactantes são utilizados em aplicações industriais, particularmente, como umectantes, surfactantes, na cosmetologia, em preparações terapêuticas, em sistemas de controle de poluição do meio ambiente por derramamento de petróleo e seus derivados (BARDI et al., 2000; CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

A produção microbiológica de surfactantes é limitada devido o alto custo para obtenção destes compostos. Estes compostos, os chamados, biossurfactantes têm despertado interesse em sua produção biotecnológica principalmente, devido sua diversidade estrutural garantindo grande potencial para aplicação. Entretanto, o uso de resíduos industriais ou fontes renováveis e de baixo custo surgem como alternativa promissora para produção deste biopolímero, contribuindo desta forma para redução dos custos e beneficiamento do meio ambiente pela redução da carga de material poluente (ALMEIDA, 2001).

A possível comercialização dos biossurfactantes depende do máximo rendimento e produtividade do processo, bem como diminuir os custos relativos à sua produção e recuperação (ALMEIDA, 2001).

Estes agentes tensoativos, os biossurfactantes, são produzidos por diversos microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, e classificados de

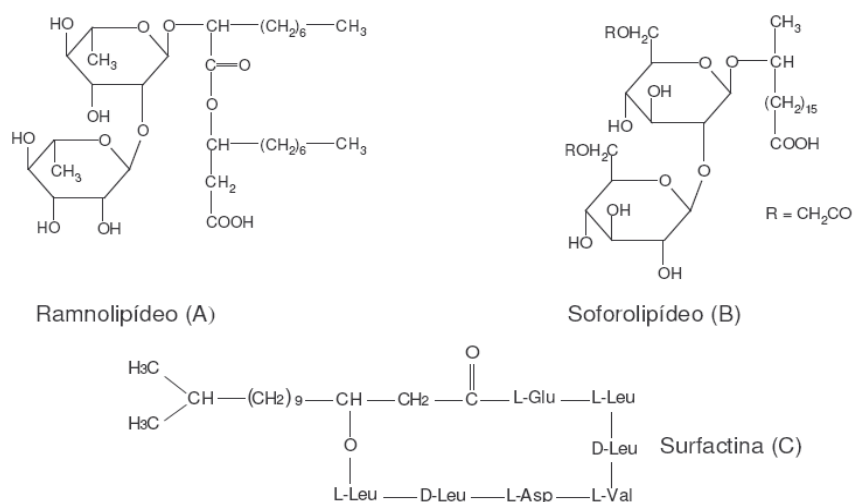
acordo com sua composição química e origem microbiana (MUTHUSAMY et.al., 2008).

### 1.3.4.2 Classificação de Biossurfactantes de acordo com os microrganismos produtores

Diferentemente dos surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com a natureza do seu grupamento polar, os biossurfactantes são classificados pela sua composição química e origem microbiana.

Segundo Rosenberg e Ron (1999), os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com seu peso molecular. As principais classes destes metabólitos secundários com baixo peso molecular incluem os glicolipídeos, lipopeptídios e fosfolipídios (Figura 7). Os surfactantes de alto peso molecular compostos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros, atuam como dispersante (RON e ROSENBERG, 2002).

De forma geral, as bactérias produzem principalmente surfactantes tipo ramnolipídeos, trealolipídeos e lipopeptídeos, enquanto que leveduras produzem soforolipídeos e manosileritritolipídeos. Já os fungos filamentosos produzem ácido ustilágico e manosileritritolipídeos (MUTHUSAMY et.al., 2008).



Fonte: MUTHUSAMY et.al., 2008

**Figura 7** - Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolipídeo (A e B) e lipopeptídeo (C).

### **1.3.4.3 Propriedades dos biossurfactantes**

De acordo com Lima (2007), os surfactantes produzidos por microrganismos são caracterizados como compostos tensoativos devido as suas propriedades. Dentre elas, podemos citar:

- Os surfactantes podem ser iônicos ou não-iônicos. Dentre os surfactantes iônicos utilizados comercialmente destacam-se os ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônicos);
- Apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial devido a formação de um filme molecular;
- Formam macro e micro emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou água em hidrocarbonetos. Para tanto, a emulsificação consiste na formação de emulsões entre duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade ocorrendo a dispersão de um líquido em outro;
- Proporcionam formação de micelas onde, em solução as moléculas de surfactantes tendem a se agregar umas com as outras, implicando na redução da tensão superficial até atingir a Concentração Micelar Crítica (CMC);
- Alguns biossurfactantes apresentam propriedades antimicrobianas, resultando na destruição de microrganismos pela lise de suas membranas celulares. No microambiente, esta propriedade é importante para evitar competição com outros microrganismos por nutrientes.

### **1.3.4.4 Função Fisiológica dos Biossurfactantes**

A função exata dos biossurfactantes ainda não foi totalmente esclarecida. No entanto, algumas funções têm sido atribuídas a esses compostos como emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água facilitando o crescimento de microrganismos em substratos hidrofóbicos, aderência ou liberação da célula devido à necessidade dos microrganismos em aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua exigência e disponibilidade nutricional, e a atividade antibiótica demonstrada por vários biossurfactantes principalmente os da classe lipopeptideo e glicopeptideo. 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; ROSENBERG e RON, 1999; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

### 1.3.4.5 Potencial de Aplicação dos Biossurfactantes

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado nas propriedades de emulsificação, umidificação, solubilização, desemulsificação, separação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos, entre outros. Sua utilização tem sido cada vez mais aceita no mercado devido a sua vasta aplicabilidade em diversas áreas, (indústrias de alimentos, farmacêutica, cerâmica, papel, metal, tratamento de efluentes, dentre outras). As aplicações mais promissoras são as de limpeza de óleo em tanques de navios e biorremediação em derramamento de óleos e petróleo (Tabela 2) (CASTIGLIONE et. al., 2009).

Durante a última década, a demanda de surfactantes aumentou em aproximadamente 300% na indústria química dos EUA. Sua produção mundial excede 3 milhões de toneladas por ano, o que corresponde 4 bilhões de dólares (CASTIGLIONE et. al., 2009).

As modificações da composição do meio de cultivo são algumas das alternativas que vêm sendo estudadas para o aumento da produtividade dos biossurfactantes. A produção destes compostos tensoativos dispensa o uso de substratos de alto valor financeiro, podendo ser utilizados rejeitos industriais, o que economicamente viabiliza o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (RODRIGUES et. al., 2006).

**Tabela 2-** Potencial de aplicações dos biossurfactantes

<b>Funções</b>	<b>Campos de Aplicação</b>
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosmético e sistema de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulação, oleodutos
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação melhorada do petróleo

Fonte: CAMEOTRA, 1998

Contudo, o principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos está relacionado à seleção de substrato, de modo que contenha um balanço correto de nutrientes, permitindo assim o desenvolvimento celular, como também, a produção de insumos de grande interesse (NISTCHKE e PASTORE, 2006).

A produção de biossurfactantes em substratos miscíveis na água são considerados mais promissores em termos de custo de produção. Há uma grande variedade de substratos miscíveis alternativos que podem ser utilizados, como melão, soro de leite, manipueira, milhocina ou resíduos de destilarias (MUTHUSAMY et.al., 2008).

De acordo com Muthusamy et. al. (2008) a matéria prima utilizada no meio de cultivo como fonte de carbono determina o tipo e as propriedades dos biossurfactantes produzidos (Tabela 3).

**Tabela 3-** Utilização de matéria-prima de baixo custo para produção de biossurfactante

<b>Matéria prima</b>	<b>Tipo de Biossurfactante</b>	<b>Microrganismo produtor</b>	<b>Rendimento Máximo (g/L)</b>
Óleo repassado	Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas sp.</i> DSM 2874	45
Óleo de babaçu	Soforolipideo	<i>Candida lipolytica</i> IA 1015	11,72
Óleo de milho	Soforolipideo	<i>Candida bombicola</i> ATCC2214	400
Óleo de girassol e soja	Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10 -129	4,31
Óleo de girassol	Lipopeptídeo	<i>Serratia marcescens</i>	2,98
Óleo residual de Refinaria	Glicolipídeo	<i>Candida Antarctica</i>	10,5
Manipueira	Lipopeptideo	<i>Bacillus subtilis</i>	2,2

Fonte: MUTHUSAMY et.al., 2008



#### **1.3.4.6 Vantagens de utilização dos biossurfactantes**

Os biossurfactantes apresentam características que representam vantagens sobre os surfactantes quimicamente sintetizados, como:

- Maior eficiência na redução da tensão superficial devido à necessidade do uso de pequenas concentrações de biossurfactantes (BOGNOLO,1999);
- Apresentam maior estabilidade térmica, de pH e força iônica podendo ser utilizado em ambientes distintos (LIMA et. al., 2007);
- Os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, tornando-os adequado para aplicação em processos de biorremediação e tratamento de resíduos (LIMA et. al., 2007);
- Apresentam menor toxicidade, representando uma excelente alternativa em substituição aos surfactantes quimicamente sintetizados devido os efeitos alérgicos causados pelos produtos artificiais. Além disso, a baixa toxicidade dos biossurfactantes permite a sua utilização em cosméticos, produtos farmacêuticos e em alimentos (LIMA et. al., 2007).

#### **1.3.5 Rejeitos Industriais**

A biotecnologia em processos fermentativos permite a utilização de subprodutos e dejetos de indústrias e agroindústrias como fontes nutricionais para microrganismos, visando obtenção de insumos (BIERGI e RINALDI, 2009).

Os sistemas industriais brasileiros abrangem uma vasta gama de atividades agrícolas ou agropecuárias, pois o país é considerado um grande fornecedor de alimentos para o mundo. Contudo, os resíduos líquidos gerados, por indústrias de alimentos, apresentam grande complexidade física e química, o que dificulta seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados (CERQUEIRA e COSTA, 2009).

A utilização de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante torna-se fundamental, considerando o elevado valor dos processos fermentativos, como também, os processos de purificação e obtenção dos biopolímeros (LI et al.,2007).

Estudos realizados por Castiglione e Costa (2009), demonstram que a produção de biossurfactantes através da utilização de resíduos agroindustriais viabiliza, economicamente, o processo para obtenção deste biopolímero, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto. Essa estratégia diminui os custos da produção do biossurfactante e, conseqüentemente, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente.

### 1.3.5.1 Manipueira

Os resíduos gerados pelas indústrias químicas e de alimentos, apresentam uma grande complexidade física e química, o que dificulta seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados (CERQUEIRA E COSTA, 2009).

Muthusamy et. al., (2008), afirmam que a manipueira é um efluente rico em carboidratos, gerado em grande escala na preparação da farinha de mandioca, podendo ser utilizado como um atrativo substrato para a produção de biosurfactante (Tabela 4).

**Tabela 4-** Composição Média da Manipueira

<b>Variáveis (mg-L)</b>	<b>Cereda (1994)</b>	<b>Fernandes (1995)</b>	<b>Barana (1996)</b>	<b>Barana (2000)</b>
Cianeto Total	444.00	206.83	140.7	112.2
Nitrogênio	4.900	2.000	3.000	1.242
Carbono	37.000	35.000	35.000	12.330
Fósforo	160	250	300	325
Potássio	1863	2.810	3.800	1.972
Cálcio	227	200	400	838
Enxofre	195	78	200	60
Magnésio	405	290	600	326
Ferro	15.3	7.0	6.4	12.4
Zinco	4.0	3.0	5.0	32,5
Manganês	3.7	3.3	3.5	2.2

A poluição ambiental proveniente da manipueira ocorre devido à presença de uma grande carga orgânica, que restringe fisicamente os locais pela formação de grandes volumes da manipueira, provocando condições de insalubridade à população e conseqüentemente, afetando a economia. Dependendo da forma de processamento das raízes, a água residual pode apresentar-se com variadas concentrações de matéria orgânica com um alto potencial tóxico do poluente, como a linamarina, substância tóxica presente na manipueira, muito solúvel em água (CARVALHO et al., 2006).

Neste contexto, os biossurfactantes são produzidos a partir de vários substratos solúveis, como os açúcares, e insolúveis como os alcanos, os óleos e os resíduos (LEE et al., 1995; GALLARDO et al., 1997; LI et al., 2003, 2007).

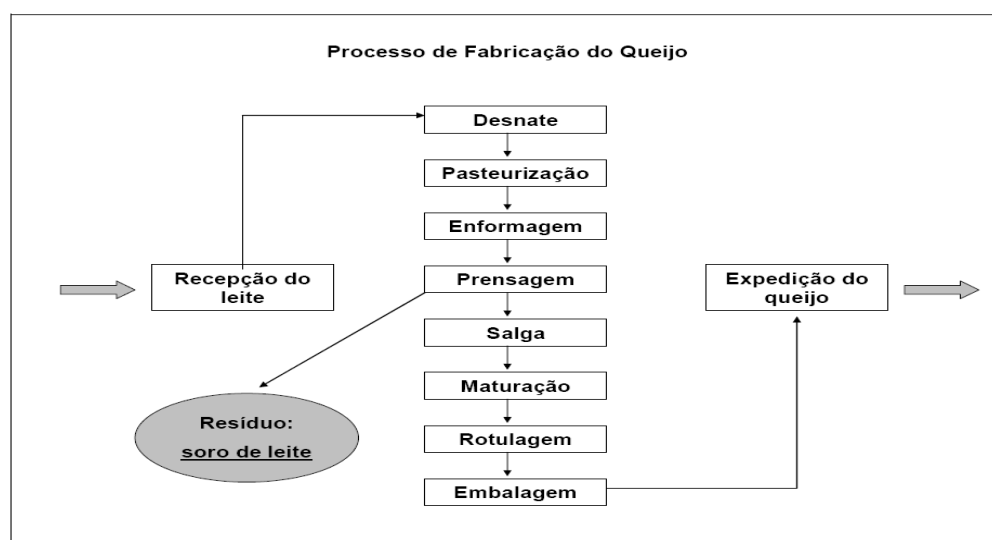
Em estudos realizados por Andrade et. al., (2009), a manipueira (efluente rico em carboidratos) foi utilizada como fonte de carbono para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*. O trabalho foi realizado utilizando-se um planejamento fatorial completo para avaliar estatisticamente os principais efeitos entre as variáveis: concentração de manipueira, de sulfato de amônio e de uréia e de acordo com os resultados, a redução da tensão superficial foi significativa em maior concentração de manipueira (10%) e menor concentração de sulfato de amônio e uréia.

### 1.3.5.2 Soro de leite

O soro é um subproduto da fabricação do queijo (Figura 6), sendo considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial usado na alimentação de animais ou descartado sem tratamento prévio (WALZEN et al., 2002). Na produção de 1kg de queijo, cerca de 9kg de soro são gerados (SGARBIERI, 2004).

No Brasil, a produção de queijo está em torno de 450.000 toneladas por ano. Isso significa que anualmente 4.050.000 toneladas de soro são produzidas (VALDUGA, et. al., 2006).

O soro de leite ou soro de queijo é um subproduto das indústrias de laticínios que apresenta sabor ácido ou doce e sua constituição depende da técnica de coagulação e fabricação do queijo (LIRA, et. al., 2009).



**Figura 08** – Etapas do processo de fabricação do queijo

Fonte: BIEGER e RINALDI, 2009

De acordo com Valduga (2006) o soro de leite in natura é composto por 36% de lactose, 9,4% proteína, 5,2% minerais, 2% lipídeos e 4,2% cloretos.

Por muito tempo, este soro foi utilizado na alimentação animal ou descartado em corpos d'água, provocando a destruição da flora e da fauna devido ao seu alto valor de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é cerca de 30000 a 50000 mg.L<sup>-1</sup>. Tal índice é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico e, considerando uma produção média de 10000 L de soro por dia, esta teria o poder poluente equivalente ao de uma população de 5000 habitantes (MACHADO et al., 2001). Portanto, a legislação ambiental exige cada vez mais das indústrias de laticínios um plano de tratamento ou reaproveitamento deste soro. Acredita-se que aproximadamente 50% de todo o soro líquido produzido não é aproveitado, sendo este número ainda maior se forem consideradas as micro e pequenas empresas (LIRA, et. al., 2009). A conversão do resíduo soro de leite para insumo é considerada como uma inovação tecnológica na cadeia de produção agroindustrial do leite, de caráter predominantemente tecnológico, pois segundo Cõnsoli e Neves (2006), este tipo de inovação prioriza ações que objetivam desenvolver novos processos de fabricação, novas matérias-primas e produtos de concepção inovadora.

Além dos problemas ambientais gerados por este resíduo, o descarte do soro é também um desperdício de material protéico e outros nutrientes (Tabela 5), uma vez que retém cerca de 60% dos nutrientes do leite (ALMEIDA et al., 2001).

Existe um grande descarte do soro de leite, sendo este produto utilizado como substrato alternativo para produção de biossurfactantes por ser economicamente viável (BIEGER e RINALDI, 2009).

**Tabela 05-** Composição típica do leite e do soro de leite

<b>Componentes</b>	<b>Leite g-100g</b>	<b>Soro g-100g</b>
Proteínas	3.6	0.65-1.05
Gordura	3.7	0.05 -0.63
Cinzas	0.7	0.37-0.95
Lactose	4.9	4.5 -5.3
Sólidos totais	12.8	6.2 -7.3

Fonte: TECNINVEST, 2000

### 1.3.5.3 Milhocina

A Milhocina, gerada durante o processo de maceração por via úmida do milho, é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os microrganismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos (SILVEIRA, 2001).

O microrganismo, quando crescido em meio contendo milhocina, produz ainda mais exopolímeros, o que facilita muito a adesão das células microbianas à semente de milho. De acordo com Silveira (2001), a água de maceração do milho pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados. A milhocina, entretanto, é de difícil conservação e seu uso, dependente do valor do produto a ser obtido (Tabela 6).

Sobrinho (2006) utilizou a milhocina (resíduo industrial do processamento de milho) como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Os resultados obtidos demonstraram que o melhor rendimento em biossurfactante foi obtido em meio de cultivo contendo 5% de resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina.

**Tabela 6:** Composição de Aminoácidos, Vitaminas e Minerais encontrados em uma Solução Concentrada de Milhocina

Aminoácidos ( % )		Vitaminas (mg/Kg )		Minerais Mg/ Kg		(%)
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio		0,14
Argniina	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 gutâmico	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 Pantotêmico	15	Fósforo		1,18
Isoleucina	3,07			Selênio	0,3	
Leucina	8,28			Zinco	60,0	
Lisina	4,75			Enxofre		0,60

Fonte: Silveira, 2001

#### 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; M, MS, C.M.; BLACK WELL, **Interdictory Mycology**, 4 ed. New York; Jonh Welley 8. Sans, Ine 1996.

ALMEIDA, K. E BONASSI, I. A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia Alimentícia**, vol. 21, n 2, p.187-192, 2001.

AKPAN A, MORGAN R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**. vol 78, n 922, p.455-9, 2002.

ANDRADE, R. F. S. ; LUNA, J. M. ; Raquel ; Clarissa ; SARUBBO, L. A. ; TAKAKI, G. M. C. . Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate. **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 701-705, 2009.

ARAÚJO, K. D.; Andrade, A. P.; Rapose, R.W.C; Rosa, P.R.O.; Júnior, E.P. Reservas de carbono e nitrogênio mineral na encosta do açude namorados no semi-árido paraibano. **Revista Caatinga**, vol.21, n.4, p.122-128, 2008.

BARDI, L.; MATTEI A.; STEFFAN, S.; MARZONA, M. "Hydrocarbondagradation as surfactant toenhance bioavailability", **Enzymeand microbial Techonology**, n 27, p. 709-713, 2000.

BARROS, L.M. **Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgengivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases**. 2005. 133p. Tese doutorado - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

BIEGER, A.; RINALDI, R.N.; Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Porto Alegre**, p. 1-14, 2009.

BOGNOLO, G. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and surface: physicochemical and engineering aspects: A. Amsterdam**, vol.152, n. 1, p. 41-52, july, 1999.

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

CARVALHO, M. F., SANTOS, A., EGLER, P.G. Avaliação da atividade poluidora da manipueira na bacia do rio Santa Rita, em Vitória da Conquista, Bahia. In: **XI Congresso Brasileiro de Mandioca**, 2006.

CASTIGLIONE, L.G; BERTOLIN, T. E; COSTA, J.A. Produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, vol. 32, n 2, p. 292-295, 2009.

CERQUEIRA, V.S.; COSTA, J.A. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, vol. 32, nº 2, 2009.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fields studies of soil remediation. In: **Journal of Applied Microbiology**, vol. 93, p. 915-929, 2002.

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

CÔNSOLI, M. A.; NEVES, M. F. **Estratégias para o leite no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2006.

COSTA, S.G.V.A; NITSCHKE, M.; CONTEIRO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 28, nº1, p. 34-38, 2008.

CLAUDINO, A.L.R. **Caracterização de isolados de *Candida spp* de cavidade bucal quanto aos aspectos fenotípicos e moleculares e obtenção de**

- mutantes heteroresistentes á antotericina B e fluconazol.** 2007. 80p.  
Dissertação Mestrado – Universidade Federal de Alfena, Minas Gerais, 2007.
- DEL PINO, J. C.; ZAGO NETO, O. G. **Trabalhando a Química dos Sabões e Detergentes.** Seção Materiais Didáticos (Site da AEQ). Porto Alegre, 71 p, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.
- DRUMOND, M.A; KILL, L.H.P; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. **In: Workshop de avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga,** Pernambuco, Brasil, 2000.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação. **Embrapa Solos,** p.412, 1999.
- FONTES, G.C.F; AMARAL, P.F.F; COELHO, M.A.C. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova,** vol. 31, nº 8, 2008.
- GALLARDO M. E.; FERRANDEZ A.; DE LORENZO, V.; GARCIA, J.L.; DIAZ, E. Desidning recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. **J. Bacteriol.** vol.179, p.7156-7160, 1997.
- GALVÍNCIO, D.; MOURA, M.S.B. Aspectos climáticos de água de chuva no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Geografia** vol. 22, n. 2, p. 15-35, 2005.
- GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.;VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeasts species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology,** vol.87, p.949-956. 1999.
- 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,** vol.88, p.379-387, 2000.



HOMMEL, R.K; HUSE,K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (torulopsis) apicola*. **Biotech. Letters**, vol.15, n8, p.853-858, 1993.

HOSPENTHAI, D. R., M. L.; BECKIUS, K. L.; FLOYD, L. L. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. vol. 5, n 1, 2006.

KIM, H.S.; J.J.W.; KIM, B.H., Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida sp.* SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 70, p. 391-396, 2006

KURTZMAN, C. P., and J. W. FELL. **The Yeasts, A Taxonomic Study**. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, The Netherlands, 2000.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid e Interface Science**. vol. 7, p. 12-20, 2002.

LEE, M.K.; SENIUS, J.D.; GROSSMAN, M.J. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. **Applied Environmental Microbiology**, vol.61, n.12, p.4362-4366, 1995.

LI, F., XU, P., MA, C., ZHENG, Y., QU, Y., Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated bacterium *Mycobacterium sp.* X7B. **Journal of Chemical Engineering of Japan** vol.36, p.1174–1177, 2003.

LI, F., ZHANG, Z., FENG, J., CAI, X., XU, P. Biodesulfurization of FENANTRENO in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. **Journal of Biotechnology**, vol.127. p.222-228, 2007.

LIMA, J.B. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**, 2007, 190p. Tese Doutorado- Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

LIMA, C.J.B; SÉRVULO,E.F.C; CARDOSO,V.L. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactantes. **Ciência e Tecnologia**, v.16, n 1, p.73-79, 2007.

LIN, S.C; Carswell, K.S;SHARMA, M.M; GEORGIU,G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* LF-2. **Applied Microbial and Biotechnology**, vol 41, p. 281-285, 1994

LIRA, H.L.; SILVA, M.C.D; SANTOS, M.R.S.V. Microfiltração do soro de leite de búfalo utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol, 29 nº1, 2009.

LYNCH, D. P. Oral candidiasis. History, classification and clinical presentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St Louis, vol.78, n.2, p.189-193, 1994.

MACHADO, R. M. G.; SILVA, P. C.; FREIRE, V. H. Controle Ambiental em indústrias de laticínios. **Brasil Alimentos**, p. 34-36, 2001

MARÇAL, V.V.M. **Isolamento e caracterização morfo genética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos**, 2005 99p. Dissertação Mestrado- Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY, T.;SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfacts: properties, commercial production and application, **Current science**, vol. 94, nº 6, p. 736-747, 2008

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, vol. 97, p. 336-341, 2006.

OSAMU YOSHIKAWA, YOSHITAKA ISHII,KEN-ICHI KOIZUMI, TAKASHI OHSHIRO, YOSHIKAZU IZUMI AND KENJI MARUHASHI. Enhancement and stabilization of desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by

feeding ethanol and sulfur components. **Journal of bioscience and bioengineering**, vol.94, n. 5, p. 447-452, 2002.

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant: effects on respiratory activity and growth. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, vol.8, p.91-102, 1979

PEREIRA, C.M. **Quantificação e identificação de Candida sp na saliva de pacientes hemofílicos**, 2002, 123p. Dissertação Mestrado- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo 2002

RODRIGUES LR, TEIXEIRA JA, OLIVEIRA R, Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, 32, 135-142, 2006.

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

ROSENBERG, E. and RON, E. Z., High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** , vol. 52, p. 154– 162, 1999.

SANTOS, F.K.G.S.; ALVES, J.V.A.; DANTAS, T.N.C. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. **In: 4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás (PDPETRO)**, 2007

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista Nutrição**, vol. 17, n 4, p. 397-409, 2004.

SILVA, W.O.; TAPIA, Y.I.P.; **Produção de biossurfactantes, Desenvolvimento de bioprocessos**, DEB, EQ, UFRJ, 2002.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 55, p. 442-445, 2001.

SOBRINHO, H. B. S.; GUSMÃO, C. A. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A.. In: **1º Workshop Meio Ambiente, Ciência e tecnologia de mãos dadas para o futuro**, Pernambuco, Brasil, 2006.

SUASSUNA, J. A Pequena Irrigação no Nordeste: Algumas Preocupações, **Revista Ciência Hoje**, vol.18, p.104 ,1994.

TECNINVEST. Estudo de Mercado do soro lácteo em Portugal. **Associação Nacional dos Industriais de Laticínios**, 2000.

TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**, p. 529-549, 1999.

VALDUGA, E.; MAZUR, S.P.; FINZER, J.R.D. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alimentos e Nutrição**, vol. 17, nº4, p 393-400, 2006

YAMAMOTO, N.; YAMAMOTO, N.; AMEMYA, H.; YAKOMORI, Y.; SHIMZU, K. & TOTSUKA, A. Eletroforetic karyotypes pf wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**. vol. 4, p. 358-363. 1991.

WALZEN, R. L., DILLARD, C. J., GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, **Critical Review of Food Science Nutricional**, vol. 42, p.353-375, 2002.

# Capítulo II

# Artigo I

**Agente de superfície ativa produzido por  
*Candida lipolytica* usando manipueira como  
substrato**

---

Manuscrito publicado no livro **Current Research Topics in Applied Microbiology  
and Microbial Biotechnology**, v1: 701-705p.

## APRESENTAÇÃO

O artigo I foi dirigido para avaliar o potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactante utilizando um planejamento fatorial completo de  $2^3$ , para investigar os efeitos e interações das concentrações das variáveis independentes manipueira, sulfato de amônio e uréia, após 96 horas de cultivo, sob a variável resposta tensão superficial e índice e atividade de emulsificação. A máxima redução da tensão superficial (26,35 mN/m) foi obtida para o meio suplementado com 10% de manipueira, 0,2% de sulfato de amônio e 0,1% de uréia. O líquido metabólico livre de células, contendo o biossurfactante, manteve suas propriedades emulsificantes após incubação a uma ampla faixa de temperaturas e nas concentrações específicas de NaCl e valores de pH. O biossurfactante produzido por *C. Lipolytica*, caracterizado como polímero complexo, removeu 81,7% do óleo queimado de motor em solo. Os resultados obtidos indicaram que a manipueira demonstrou ser um substrato rico em nutrientes para produção do biossurfactante, com possível aplicação em processos de biorremediação.

## Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate

R. F. Silva Andrade<sup>1,2</sup>, J. M. Luna<sup>2,4</sup>, R. D. Rufino<sup>2,3</sup>, C. D. Costa Albuquerque<sup>2</sup>, L. A. Sarubbo<sup>2</sup> and G. M. de Campos-Takaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biological Sciences Post-graduation Course, Catholic University of Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Nucleus of Research in Environmental Sciences (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

<sup>3</sup> Fungal Biology Post-graduation Courses, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

<sup>4</sup> Biological Sciences, Post-graduation Courses, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

The production of a biosurfactant by *Candida lipolytica* was carried out using cassava flour wastewater as a low-cost substrate. A factorial design was previously carried out to investigate the effects and interactions of the concentrations of cassava flour, ammonium sulphate and urea on the surface tension after 96 h cultivation. Maximum surface tension reduction (26.35 mN/m) was achieved for the medium supplemented with 10% cassava flour, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea. The biosurfactant containing cell-free broth retained its emulsification properties after incubation at a wide temperature range and under specific concentrations of NaCl and pH values. The isolated biosurfactant seemed to be a carbohydrate-protein-lipid complex. The cell-free broth containing the biosurfactant removed 62.2% of motor oil adsorbed in sand, while the whole metabolic broth removed 81.7% of the oil, indicating that cassava flour wastewater is a rich and economic substrate for producing an effective biosurfactant applicable to bioremediation processes.

**Keywords** Biosurfactant; *Candida lipolytica*; Cassava flour wastewater

### 1. Introduction

Surfactants, amphiphilic molecules consisting of a hydrophilic head and a hydrophobic tail, are the active ingredients found in soaps and detergents. Due to their ability to concentrate at the air-water interface, they are commonly used to separate oily materials from a given medium. Surfactants increase the aqueous solubility of hydrophilic molecules by reducing their surface/interfacial tension at air-water and water-oil interfaces [1].

The commercial importance of surfactants is evidenced by the upward trends in producing them and the increasing number of industrial applications which use them. Almost all surfactants being currently produced are chemically derived from petroleum. However, these synthetic surfactants are usually toxic themselves and are difficult to degrade using microorganisms [2].

Even though interest in biosurfactants is steadily increasing, these compounds still do not compete economically with synthetic surfactants. To reduce production costs, different routes could be investigated such as by increasing yields and product accumulation; developing economic engineering processes, and using cost free or cost-credit feedstock to grow microorganisms and produce surfactants. This paper describes the application of a factorial design for enhancing the production of biosurfactant by *Candida lipolytica* UCP 0988, using cassava flour wastewater as a low-cost substrate.

### 2. Materials and Methods

*Candida lipolytica* UCP 0988 was kindly supplied from the Culture Collection of the Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

The micro organism was maintained in an anamorph state at 5°C on Yeast Mold Agar (YMA) slants containing (w/v): yeast extract -0.3%, malt extract - 0.3%, peptone - 0.5%, glucose - 1% and agar - 2%. Transfers were made to fresh agar slants each month to maintain viability. The *Candida lipolytica* was grown on solid medium at 27°C for 72 h; then, a loopful of the cream-colored culture was transferred to Erlenmeyer flasks of 250-ml containing 50-ml of the liquid medium Yeast Mold Broth (YMB) and



incubated aerobically for one day at 27°C on a rotary shaker (150 rpm). The YMB culture contained  $10^7$  cells/ml and was used to initiate growth in the liquid Yeast Water Medium-YWM, composed of ammonium sulphate and urea dissolved in distilled water supplemented with cassava flour wastewater. The biosurfactant production was evaluated using a statistical design. A  $2^3$  full factorial design was carried out to verify the effects and interactions of cassava flour concentration, ammonium sulphate concentration and urea concentration on the production of biosurfactant. In this design, a set of 12 experiments, with four replicates at the central points, was performed. The range and levels of the components (factors or independent variables) under study are given in Table 1. The production experiments were carried out using Erlenmeyer flasks (500 ml) containing 100 ml of culture medium incubated for 96 h under orbital shaker (150 rpm). After this period, aliquots were used to measure surface tension, emulsification index and emulsification activity (U.A.E.) on the cell-free broth obtained centrifuging the cultures at 5000 rpm for 20 minutes. The surface tension was determined with a Tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments LTD - Finland) using the Du Nouy ring method at room temperature. The emulsification index was analyzed according to Cooper and Goldenberg [3], whereby 2 ml of cotton oil was added to 2 ml of the cell-free broth in a graduated screw cap test tube and vortexed at high speed for 2 min. Negative control of emulsification was carried out using water. Emulsion stability was determined after 24 h, and the emulsification index (E) was calculated by dividing the measured height of the emulsion layer by the mixture's total height and multiplying by 100. Emulsification activity was determined using the method described by Cirigliano and Carman [4]. The cell-free broth (2ml) obtained after centrifugation was diluted with 2ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 3.0) and 1ml of one of the following substrate corn oil. The mixture was placed in a screw-capped tube and shaken for 2 min at 27 °C. The resulting uniform emulsion was allowed to sit for 10 min, after which its absorbance was measured at 540 nm. The blank used contained 2 ml of sterile production medium. One unit of emulsification activity was defined as the amount of emulsifier that affected an emulsion with an absorbance at 540 nm of 1.0. Stability studies were conducted after selection of the best condition for biosurfactant production according to the factorial design using the cell-free broth after 96 hours cultivation. Samples were maintained at 0 °C, 5 °C, 70 °C, 100 °C and 120 °C for 10 minutes and cooled to room temperature, after which the emulsification index was measured. To study the pH stability, the pH of the cell-free broth was adjusted to different pH values (2 to 12) and the emulsification index was measured. The effect of NaCl concentration (2 to 12%) on the emulsification index of the cell-free culture broth was also determined. For quantitative determinations, the biosurfactant was isolated by acid precipitation with chloridric acid according to Nitschke and Pastore [5]. Subsequently, the sample was centrifuged at 5.000 rpm for 20 min at 28 °C and lyophilized. Protein in the isolated biosurfactant was estimated by using the total protein test kit from Labtest Diagnóstica S.A., Brazil. Sugars were measured by the phenol l-sulphuric acid method using glucose as standard [6]. The lipid composition of the crude bioemulsifier was determined according to Manocha [7]. The removal of motor oil (10 ml) adsorbed in a sand sample (20.0 g) was conducted with 300 ml the cell-free broth and the whole broth obtained after 96 hours, during 48 hours at 150 rpm, according to Nitschke and Pastore [5].

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Production of the biosurfactant

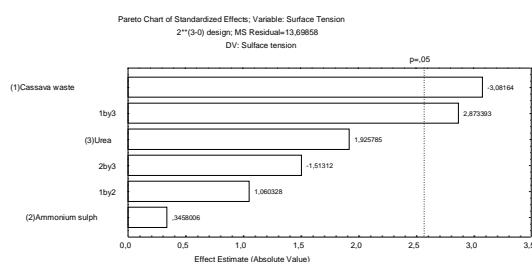
The production of the biosurfactant was conducted using a factorial design, as described in Table 1. The numbers from one (1) to eight (8) correspond to the experimental conditions obtained from the combination of the variables tested and the numbers nine (9) to twelve (12) correspond to the conditions of the central point. From all the runs carried through, the run number two had shown the higher surface tension reduction, while the run number five showed the higher emulsification index. Among these two runs, the one represented by the number two (10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea) was selected for further studies of production and characterization of the biosurfactant, once it conducted to a better surface tension value and also great emulsification index and activity values, which indicate that the surface agent produced has attractive properties as ability to reduce substantially the surface tension and to act as an emulsifier.

**Table 1** Surface tension, emulsification index and emulsification activity values obtained in the  $2^3$  full factorial design used for biosurfactant production by *C. lipolytica* grown in Yeast Water Medium during 96 hours. Numbers one (1) to eight (8) are the runs corresponding to the experimental conditions obtained from the combination of the variables tested and numbers nine (9) to ten (12) are the runs corresponding to the experimental conditions of the central point

Conditions	Cassava flour wastewater (%)	Ammonium sulphate (%)	Urea (%)	Emulsification index of cotton oil (%)	Emulsification activity of corn oil (U.A.E)	Surface tension (mN/m)
1	5.0	0.2	0,1	30.35	2.024	48.33
2	10.0	0.2	0.1	26.5	1.934	26.35
3	5.0	1.0	0.1	21.42	2.048	46.80
4	10.0	1.0	0.1	16.66	2.048	37.61
5	5.0	0.2	0.3	28.57	2.055	46.19
6	10.0	0.2	0.3	18.75	2.025	46.49
7	5.0	1.0	0.3	20.28	1.705	43.98
8	10.0	1.0	0.3	28.57	2.007	42.59
9	7.5	0.6	0.5	25.00	2.040	46.97
10	7.5	0.6	0.5	25.00	2.038	46.91
11	7.5	0.6	0.5	30.36	2.015	47.02
12	7.5	0.6	0.5	33.33	2.023	47.12

### 3.2 Effect of variables used on the surface tension

Figure 1 illustrates the Pareto Chart, with 95 % confidence level, for effect estimates, in absolute values. From the chart, it can be seen that the cassava flour wastewater influenced positively the reduction of the surface tension in the range studied, while urea and ammonium sulphate did not significantly influence the surface tension reduction. The association between the variables cassava flour wastewater and urea has been statistically significant, acting negatively in reducing the surface tension after 96 hours of cultivation.



**Fig. 1** Pareto Chart of standardized effects for surface tension of the cell-free broth from *C. lipolytica* after 96 hours of cultivation for the 2<sup>3</sup> full factorial design. The point at which the effect estimates were statistically significant (at p = 0.05) is indicated by the broken vertical line

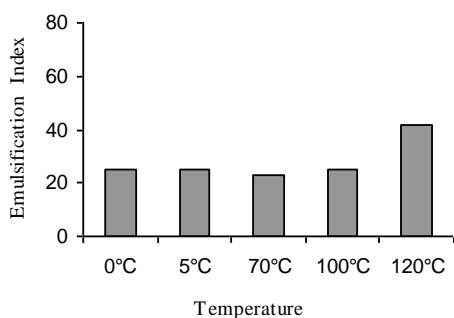
### 3.3 Stability of biosurfactant according to the emulsification index

The stability tests were conducted for the biosurfactant produced in the medium formulated with 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea, according to the previous factorial design. The tests conducted on the cell-free broth, regarding the variation of temperature, demonstrated an effective stability of the emulsification indexes in the temperature range studied in this work (Figure 2) although an increase of 15% of activity had been observed at 120 ° C (Figure 2). Similar behavior towards stability was also observed for the biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* [8] and *Nocardia* SP. L-417 [9] when the cell-free broths were heated to 100 ° C. Liposan of *Candida lipolytica* was found to be relatively stable between 30 and 90 ° C, but lost 60% of its activity after being boiled for 1 hour [4] Regarding the influence of pH on the emulsification index of the cell-free broth containing the biosurfactant (Figure 3), there was a wide variation in all tracks tested with stability only in pH 6. The

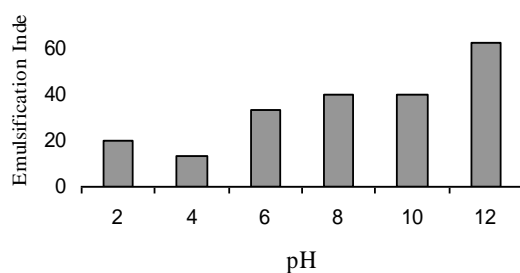
addition of NaCl did not show a stability pattern of the emulsification, once the percentile values remained unaltered in the presence of 2, 6 and 10 % of salt in the cell-free broth containing the biosurfactant (Figure 4). The biosurfactant from *C. glabrata* also achieved stability in the presence of 10% of NaCl [10].

### 3.4 Chemical composition of biosurfactant selected

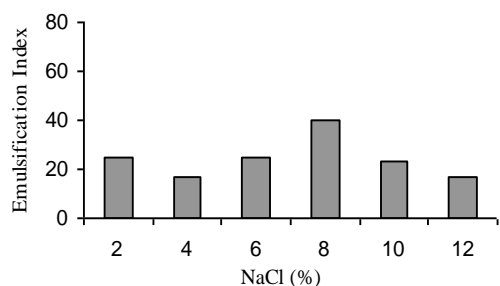
The biochemical analysis of the biosurfactant produced by *C. lipolytica* in the medium formulated with 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea showed the presence of carbohydrates and proteins, and lipids in a minor quantity. Others emulsifiers produced recently by *C. lipolytica* seem to be also polysaccharide-protein-lipid complexes [1, 10].



**Fig. 2** Effect of temperature on the emulsification index of corn oil by the cell-free broth of *C. lipolytica* grown in medium containing 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea during 96 h



**Fig. 3** Effect of pH on the emulsification index of corn oil by the cell-free broth of *C. lipolytica* grown in medium containing 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea during 96 h



**Fig. 4** Effect of NaCl addition on the emulsification index of corn oil by the cell-free broth of *C. lipolytica* grown in medium containing 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea during 96 h

### 3.5 Application of the biosurfactant in the oil removal

The removal of motor oil from sand utilizing the cell-free broth containing the biosurfactant produced by *C. lipolytica* in the medium formulated with 10% cassava flour wastewater, 0.2% ammonium sulphate and 0.1% urea showed values of 62.2% while the whole broth removed 81.7% of the oil. Abu-Ruwaida et al. [11] showed that the cell-free broth containing a biosurfactant produced by *Rhodococcus* cells was able to recover 86% of crude residual oil adsorbed in the sand while Cameotra and Makkar [8] demonstrated that the biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* was able to recover 56% of the oil adsorbed in a packed column containing sand.

#### 4. Conclusions

The results obtained from this study show that the biosurfactant produced by *C. lipolytica* cultivated in a low-cost medium has attractive properties such as low surface tension and emulsification capacity over a wide range of temperature and under specific NaCl and pH conditions. Its ability to recover oil from oil-saturated sand was also demonstrated. Thus, these characteristics indicate the potential for using the biosurfactant in the oil industry, especially in MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery). Studies are in progress to scale up growth conditions and biosurfactant production in a bioreactor.

**Acknowledgements** This work was financed by Funding Agency for Studies and Projects (FINEP), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Catholic University of Pernambuco, Brazil.

#### References

- R. D. Rufino, L.A. Sarubbo, G.M. Campos-Takaki. [1] World J Microbiol Biotechnol **23**, 729 (2007).
- J. [2] M. Luna, L.A. Sarubbo, G.M. Campos-Takaki. Braz. Arch. Biol. Technol. Brazilian Archives of Biology and Technology. IN PRESS (2006).
- [3] D. G. Cooper, B.G. Goldenberg. Appl Environm Microbiol **53**, 224 (1987).
- [4] M. C. Cirigliano, Carman G.M. Appl Environm Microbiol **50**, 846 (1985).
- [5] M. Nitschke. G.M. Pastore. Quimica Nova, **25**, p. 772 (2002).
- [6] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton. Anal Chem **28**, 350-356 (1956).
- [7] M. S. Manocha, G.San-Blas, S. Centeno. J Gen Microbiol **117**, 147-154 (1980).
- [8] S.S.Cameotra and R.S. Makkar. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**, 520-529 (1998).
- [9] S. H. Kim, E. J. Lim, S. O. Lee, J.D. Lee, T.H. Lee. Biotechnol Appl Biochem **31**, 249 (2000).
- [10] L. A.Sarubbo, J. M.Luna, G. M. Campos-Takaki. Eletronic J Biotechnol **9**, 400 (2006).
- [11] A. S.Abu-Ruwaida, I. M.Banat, S. Haditirto, A. Salem, M. Kadri. Acta Biotechnologica **2**, 315 (1991).

# Capítulo III

**Produção de biossurfactante por *Candida glabrata*  
isolada de solo do semi-árido em fermentação  
submersa utilizando rejeitos industriais (milhocina e  
soro de leite), como meio de baixo custo**

---

\* Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

**Applied and Environmental Microbiology**

**Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* isolada de solo do semi-árido em fermentação submersa utilizando rejeitos industriais (milhocina e soro de leite), como meio de baixo custo**

Rosileide Fontenele da S. Andrade<sup>1,6</sup>; Adriana A. Antunes<sup>2,6</sup>; Maria A.

Resende<sup>3</sup>; Valdemir Alexandre<sup>4</sup>; Luciana de O. Franco<sup>5</sup>; Galba M. Campos -Takaki<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; <sup>2</sup>Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; <sup>3</sup> Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil; <sup>4</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; <sup>5</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; <sup>6</sup>Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

\*Autor Correspondente: Galba Maria de Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, Recife-Pernambuco, Brasil, Cep: 50050-590, Tel: +51-81-21194044, Fax: +55-81-21194043, E-mail : gmctakaki@pesquisador.cnpq.br

### 3.1 RESUMO

Neste trabalho foi utilizada a levedura isolada de solo do semi-árido (PE, Brasil), identificada como *Candida glabrata*, através de testes bioquímicos e moleculares. A levedura demonstrou potencial biotecnológico para a produção de biossurfactante em meio de cultura formulado com rejeitos industriais, milhocina (3%) e soro de leite (20%), através de um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional-DCCR. O biossurfactante extracelular apresentou caráter aniônico, com capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 28,53 mNm, apresentando um baixo valor de CMC (1%) e emulsificação a 88% ( $E_{24}$ ), através da utilização de óleo queimado de motor. O líquido metabólico livre de células, contendo o biossurfactante, demonstrou estabilidade da tensão superficial em valores extremos de concentrações de sal. O biossurfactante produzido foi caracterizado como polímero complexo, constituído de 35% de lipídeos, 30% de proteína e 22,9%. O biossurfactante na concentração de 0,001% não apresentou toxicidade para *Artemia salina*. A aplicação do biossurfactante produzido por *C. glabrata* removeu 95% do óleo queimado de motor presente em solo arenoso, demonstrando grande potencial de uso em processos de biorremediação, em especial, para remoção de petroderivados.

**Palavras chave:** *Candida glabrata*. Rejeitos industriais. Petroderivados. Biorremediação



### 3.2 ABSTRACT

In this work we used the yeast isolated from soil in semi-arid (PE, Brazil), identified as *Candida glabrata*, through biochemical and molecular. The strain showed potential for biotechnological production of biosurfactant in the culture medium formulated with industrial wastes, corn steep liquor (3%) and whey (20%) through experimental planning a Central Composite Rotational Design-CCRD. The biosurfactant showed extracellular anionic character, capable of reducing the surface tension of water from 72 mN/m to 28.53 mN/m, showing a low value of CMC (1%) and emulsification of 88% (E24) through the use of oil burned engine. The cell-free metabolic liquid containing the biosurfactant showed stability of the surface tension at the extremes of salt concentrations. The isolated biosurfactant was characterized as a complex polymer composed of 35% lipids, 30% protein and 22.9%. Biosurfactant concentration of 0.001% showed no toxicity to *Artemia salina*. The application of the biosurfactant produced by *C. glabrata* removed 95% of engine oil burned in this sandy soil, showing great potential for use in bioremediation processes, in particular, to remove petroderivados.

**Keywords:** *Candida glabrata*. Waste industrial. Derived from petroleum. Bioremediation.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Dentre as regiões semi-áridas do Brasil, o município de Serra -Talhada (PE), possui clima semi-árido e clima muito quente, localizando-se na microrregião do Pajeú, no Sertão Pernambucano (40).

A ausência, escassez, irregularidade e má distribuição das precipitações pluviométricas na estação chuvosa, as intensas evaporações durante o período de estiagem e o elevado escoamento superficial das águas, constituem um fator limitante de sustentabilidade afetando a sobrevivência de todos os seres vivos nestas regiões (40).

O emprego da biotecnologia aliada ao uso de microrganismos como agentes degradadores de diversas substâncias, indicam o tratamento biológico como um dos mais eficientes métodos para se reduzir os efeitos adversos dos contaminantes sobre o meio ambiente. Portanto, o elevado potencial dos microrganismos, em aplicações biotecnológicas, tem contribuído para o isolamento e identificação de novas espécies (41).

A diversidade microbiana possui um importante papel no funcionamento e manutenção do equilíbrio dos ecossistemas devido sua variedade genética. Estes seres podem ser encontrados em diversos ambientes desde regiões com clima quente a frio, além de solo, ar e água (31).

Atualmente no mundo industrializado, a contaminação por compostos orgânicos tóxicos tornou-se um dos maiores problemas a ser enfrentado. No século XXI, uma ampla variedade de substâncias tóxicas e perigosas tem sido introduzida no meio ambiente, em especial, aquelas decorrentes de despejos de efluentes industriais e as provenientes de acidentes envolvendo derrames de petróleo e seus derivados. O aumento dos problemas ligados à poluição ambiental tem acarretado maior

conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes e da necessidade de remediar esses locais impactados (11).

Os sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental. Para tanto, este processo vem se destacando, pois além de eliminar os poluentes, é também tipicamente mais econômico que métodos tradicionais empregados (41).

Vários microrganismos possuem capacidade de produzir agentes tensoativos, devido ao rápido desenvolvimento e habilidade de adaptação em diferentes condições ambientais (19, 38).

*Candida glabrata* é uma levedura pertencente ao Reino Fungi, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Candida* e Espécie *glabrata* (25). Dentre as espécies de *Candida*, esta levedura é a única que não apresenta em sua estrutura pseudo-filamentos. Apresenta como característica macroscópica coloração opaca, de branco a creme, consistência cremosa e lisa possuindo em sua estrutura microscópica apenas os blastoconídeos (25).

A baixa disponibilidade dos contaminantes do solo aos microrganismos é um dos principais fatores que interferem no processo de remediação. Uma alternativa de incremento da metabolização é possibilitar a remoção ou eliminação dos contaminantes através da solubilização destes substratos empregando-se biossurfactantes, devido sua capacidade de emulsificar misturas entre líquidos com diferentes graus de polaridade (16).

Os biossurfactantes são moléculas que apresentam grupo hidrofílicos e hidrofóbicos agindo na interface entre fases fluidas, produzidos através da biotransformação de matérias-primas renováveis, apresentando uma maior vantagem em relação aos surfactantes quimicamente sintetizados. A formação de um filme molecular, entre as interfaces, possibilita a redução da tensão superficial. Estas

propriedades tornam os biossurfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais como: detergência, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (11).

O problema econômico da produção de biossurfactante pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes. Dentre estas fontes, os resíduos como o soro de leite, um subproduto da indústria de laticínios, rico em nutrientes é constituído por lactose, proteína, minerais, lipídeos e cloretos. Outra fonte alternativa para produção de biossurfactantes é a milhocina, gerada pelo processo de maceração do milho, constituída por aminoácidos, vitaminas e sais minerais (45, 47).

Considerando a escassez de trabalhos no Brasil que tratem da micobiota, em especial de leveduras, em solos da região semi-árida do Nordeste (Serra -Talhada, PE), e a crescente aplicabilidade de metabólitos secundários na área biotecnológica, tornou-se fundamental isolar e identificar novas linhagens de microrganismos produtores de biossurfactante. Portanto, no artigo II, foi investigado o potencial biotecnológico da *Candida glabrata*, isolada de solo de Serra-Talhada (PE), no meio em que obteve-se produção máxima de biossurfactante, produzido por *Candida lipolytica*, conforme condições estabelecidas pelo artigo I. Porém, a produção de biossurfactantes pela *Candida glabrata* nestas condições, não foram satisfatórias havendo a necessidade da modificação do meio de produção do biopolímero. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o conhecimento do potencial biotecnológico da produção de biossurfactantes por amostras de *Candida lipolytica*, pertencentes ao banco de culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da UNICAP, e *Candida glabrata*, isolada de solos do semi-árido do estado de Pernambuco, utilizando-se meio de produção economicamente viável composto por rejeitos industriais.

## **3.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.4.1 Solo**

Para o isolamento das leveduras do Gênero *Candida*, latossolos foram coletados no mês de abril de 2008 em Serra talhada – PE, no município de Caiçarina da Penha, localizado no III Distrito. Diferentes pontos do local foram previamente demarcados e a área separada em glebas homogêneas. As amostras de solos foram coletas em zigue-zague, a cada 20 pontos do talhão à 20 cm de profundidade e posteriormente, conduzidos ao Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientas (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco. A temperatura dos solos, à 20 cm de profundidade, foi 35°C e o índice pluviométrico 600 mm anuais.

### **3.4.2 Microrganismo**

A linhagem de *Candida glabrata* (UCP 1556), isolada do solo do semi-árido do Estado de Pernambuco, encontra-se mantida no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, sendo mantida em meio Sabouraud Dextrose Ágar (10).

### **3.4.3 Substratos**

Os substratos utilizados foram a milhocina, subproduto do beneficiamento do milho da indústria Corn e soro de leite proveniente da indústria de laticínios de São Bento do Una (PE), utilizados como meio de produção de biossurfactante.

### **3.4.4 Planejamento experimental**

Foi realizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com fatorial completo 2<sup>2</sup>, 4 pontos centrais e 4 pontos axiais.

Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações manipuladas, e pH inicial foi utilizado o software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft® (46).

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

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2 + \beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 + \beta_{10} X_1 X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 X_2 + \beta_{12} X_1^2 X_3 + \beta_{13} X_1 X_2^2 + \beta_{14} X_1 X_2 X_3 + \beta_{15} X_1 X_3^2 + \beta_{16} X_2 X_3^2 + \beta_{17} X_1^2 X_2 X_3 + \beta_{18} X_1 X_2^2 X_3 + \beta_{19} X_1 X_2 X_3^2 + \beta_{20} X_1^2 X_2 X_3^2 + \beta_{21} X_1 X_2^2 X_3^2 + \beta_{22} X_1^2 X_2^2 X_3^2$$

é uma das vantagens do uso de um DCCR. Em geral, num DCCR com dois níveis originais, tem-se  $2^2$  pontos centrais e um número arbitrário de pontos centrais (6, 34).

### 3.4.5 Isolamento das leveduras

A partir das suspensões do solo, 0,1mL das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  foram transferidas para placas de Petri, contendo o meio Sabouraud dextrose ágar com cloranfenicol, incubadas à temperatura de 28° C, durante 7 dias, com observações a cada 24 horas. Após o crescimento as leveduras foram transferidas para placas de Petri contendo o meio Sabouraud dextrose ágar com a finalidade de confirmar a pureza das culturas e mantida em tubos de ensaio com o mesmo meio.

### 3.4.6 Identificação e caracterização morfológica, bioquímica e molecular da levedura isolada

**3.4.6.1 Microcultivo:** para identificação morfológica microscópica da levedura, foi utilizado o meio de cultura ágar fubá (17,0g) e água destilada (1000ml), adicionado de 1% do tween 80. Para a execução da prova, o ágar fubá fundido foi depositado em lâminas de vidro dentro de placas de Petri esterilizadas. Após solidificação do ágar, a

amostra foi semeada em estrias sobre a superfície do meio, colocando-se uma lamínula no centro da lâmina. No interior da placa colocou-se algodão esterilizado e embebido em água destilada, para manter a umidade do meio. Após a incubação por 48 horas a temperatura de 28 C a leitura foi realizada em microscópio óptico para a verificação de produção de filamentação e de clamidoconídios, com aumento de quatrocentas vezes. A identificação da espécie foi baseada na análise da morfologia, perfil bioquímico e análise molecular, descritos a seguir.

**3.4.6.2 Zimograma:** para realização da prova de fermentação foi adicionada 3 mL do meio basal (extrato de levedura e peptona acrescentado de azul de bromotimol e etanol a 95%) em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan m seu interior. Após esterilização do meio foi adicionado 1,5 mL da solução de açúcares a 6% (glicose, sacarose, trealose, lactose e maltose). Em seguida, 0,2 mL da suspensão da levedura com turvação correspondente ao tubo número 10 da escala de Mac Farland foi inserida ao tubo de ensaio e incubada por 72 horas a 28 C. A leitura foi realizada considerando a produção de ácido pela mudança do pH ( azul para amarelo) e pela produção de gás no interior do tubo de Durhan.

**3.4.6.3 Assimilação de nitrogênio:** o teste de assimilação de fontes nitrogenadas foi realizado utilizando o meio Meio Yeast Carbon Base (YNB), composto por dextrose 20,0g, fosfato de potássio monobásico 1,0g, sulfato de magnésio 7 H<sub>2</sub>O 0,5g, ágar 20,0g e água destilada 1000ml), sem a presença de fontes de nitrogênio. Em seguida, preparou-se uma suspensão da levedura com turvação correspondente ao tubo número 10 da escala de Mac Farland e transferiu-se 1 mL desta suspensão para placa de Petri acrescentando o meio YNB previamente esterilizado. Após a solidificação do meio, a placa foi demarcada e preenchida com os seguintes compostos nitrogenados (Peptona e Nitrato de potássio) p72 horas a 28 C.

**3.4.6.4 Reação em Cadeia Polimerase-PCR:** para confirmação da identidade, o DNA da levedura previamente identificada como pertencente ao Gênero *Candida*, foi extraído e submetido a PCR para amplificação da região interna transcrita 2 (ITS2) localizada entre as subunidades 5,8S e 28S do rDNA (ITS3/ITS4).

**3.4.6.5 Extração do DNA:** foram transferidos 2 a 3 alçadas (aproximadamente 40mg) das colônias obtidas para tubo tipo eppendorf (2ml) contendo 500mL de TENTS (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH8; 200mM NaCl; 2% triton X-100; 1% SDS), para ressuspensão das células. Posteriormente, as amostras foram levadas para banho Maria a 100°C por 15 min. Após foram mantidas a temperatura de -20°C por 20 minutos. Após sair do gelo homogeneizou-se a amostra e retirou-se 10 µL transferindo-se para outro eppendorf. A agitação foi feita em vórtex por 2 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos, removendo-se o sobrenadante para um novo tubo tipo eppendorf. A este tubo foi adicionado 1 volume de etanol absoluto e resfriado a -20°C por 1 hora. Em seguida centrifugou-se (13000 rpm, 15 minutos) e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 500ml de TE (10mM Tris pH 8,2; 1mM EDTA pH 8) contendo RNase na concentração 50mg/ml. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Depois se adicionou novamente fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugou-se (13000 rpm, 15 minutos). A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo tipo eppendorf contendo 20 mL de NaCl 5M e um volume de etanol absoluto. O material foi colocado no freezer a -20°C por 1 hora e em seguida centrifugado (13000 rpm, 15 minutos). Por fim, descartou-se o sobrenadante, lavou-se as células com 500mL de etanol gelado a 70%. Depois de seco a temperatura ambiente, as células foram ressuspensas com 50mL de TE.

**3.4.6.6 Quantificação do DNA genômico:** o gel de agarose a 0,8% foi preparado utilizando-se TBE 0,5X.. Posteriormente, foi transferido para forma e deixado



polimerizar por 40 minutos. O DNA foi retirado da geladeira e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. No gel foi colocado um marcador (100pb) e as amostras em seguida (5 µL amostra para 2 µL de tampão de corrida). A eletroforese foi realizada em cuba submarina (Amersham Biosciences) por 60 minutos a 80 Volts. O gel foi observado em transluminador sob luz UV e sua imagem armazenada, usando o sistema digital Kodak (modelo EDAS-290).

**3.4.6.7 Amplificação da região ITS2:** a amostra foi submetida a PCR utilizando os “primers” universais específicos da região ITS2 (ITS3 – 5`-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3` e ITS4 – 5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`) para confirmação da identidade. Segundo Chen et al. (12) os primers ITS3/ITS4 amplificam com um produto de PCR de aproximadamente 414pb, para espécies de *Candida glabrata*. A mistura de PCR foi preparada em um volume total de 50 µl, contendo 10 mM de cada dNTP, 20 pares de moles de cada “primer” espécie específico, uma unidade de Taq e 20 ng de DNA genômico (20ng). A amplificação foi realizada em termociclador modelo 9700 da Applied Biosystems com programa descrito por Chen et al (12), um ciclo de 95o C por 6 minutos, 25 ciclos ( 95oC por 30 segundos, 65oC por 30 segundos, 72oC por 30 segundos) e extensão final a 72o C por 10 minutos. Os fragmentos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE a 100 V por 45 minutos. A imagem do gel foi gravada utilizando-se o sistema digital Kodak (modelo EDAS-290).

**3.4.6.8 Seqüenciamento e Análise dos dados:** o amplicon foi purificado com o Kit Purelink (Invitrogen) e o seqüenciamento foi realizado na plataforma de seqüenciamento de DNA da UFPE. O dados foram analisados pela ferramenta BLASTn (NCBI).

### **3.4.7 Produção de Biossurfactante por *Candida glabrata***

**3.4.7.1 Pré-inóculo:** o inóculo foi preparado inoculando células de *C. glabrata* no meio Caldo Sabouraud (peptona de carne 3g, glicose 20g e água destilada 1000 mL), mantido à temperatura de 28°C por 24 horas a 150 rpm.

**3.4.7.2 Fermentação submersa:** a produção do biossurfactante foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio constituído por milhocina e soro de leite, utilizando um planejamento experimental DCCR, de acordo com as Tabelas 1 e 2. O pré-inóculo correspondeu a 5% do cultivo com D.O.<sub>600nm</sub> de 0,8. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 72 horas, à temperatura de 28°C. Após esse período a cultura foi centrifugada a 4000 rpm, seguida de filtração (nylon silkscreen 120 mesh), a fim de separar as células do líquido metabólico. O líquido metabólico foi submetido à determinação da tensão superficial, atividade e índice de emulsificação e determinação do pH.

**3.4.7.3 Cinética de crescimento:** o crescimento de *Candida glabrata* foi acompanhado através da determinação da tensão superficial e densidade óptica ao comprimento de onda de 600nm. Alíquotas foram coletadas a cada 4 horas, em período total de 12 horas, e posteriormente foram coletadas a cada 24 horas ao total de 120 horas.

**3.4.7.4 Determinação da estabilidade:** a estabilidade do biossurfactante foi avaliada a partir da condição selecionada do planejamento experimental DCCR, de acordo com a determinação da tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células com diferentes pHs ( 2,4,6,8,10 e 12), diferentes concentrações de

NaCl (2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e diferentes temperaturas ( 0°C, 5°C, 70°C, 100°C e 120°C), por 10 minutos.

**3.4.7.5 Determinação do pH:** foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310) para a medição do pH das alíquotas coletadas dos meios de produção livre de células.

**3.4.7.6 Determinação da tensão superficial:** para a determinação da tensão superficial o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante após 72 horas de cultivo, foi medido em um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) utilizando-se o anel de DU NUOY, através de sua imersão no líquido, registrando-se a força requerida para retirá-lo através da interface ar-líquido, de acordo com (26)

**3.4.7.7 Determinação do índice de emulsificação:** a determinação do índice de emulsificação foi realizada em todas as condições do planejamento experimental DCCR. As amostras foram centrifugadas a 4000rpm, à temperatura de 5°C, durante 20 minutos e o sobrenadante foi analisado segundo o método de Cooper e Goldenberg, (15). Foi adicionado 1,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo queimado de motor e demais óleos como soja e milho, em tubos graduados, e a mistura foi agitada em vórtex por um minuto. Após 24 horas de repouso, as emulsões foram formadas e calculou-se a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicado por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem.

**3.4.7.8 Determinação da atividade de emulsificação:** para a determinação da atividade emulsificação, as amostras retiradas após 72 horas de fermentação, foram filtradas em papel Wathmann N°1, centrifugadas a 4000 rpm, durante 20 minutos, e, em seguida, analisadas segundo a metodologia proposta por Cirigliano e Carman (13).

Foram colocados 2,0 mL do líquido metabólico livre de células, sendo adicionado 2,0 mL do tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3), com 1,0 mL do óleo de milho e demais óleos como soja e óleo de algodão em tubos graduados. 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 à 540nm.

### **3.4.8 Isolamento e caracterização do biossurfactante**

**3.4.8.1 Extração:** o biossurfactante produzido na condição selecionada do planejamento experimental DCCR, devido à menor tensão superficial foi extraído utilizando o método de precipitação com sulfato de amônio. Adicionou-se sulfato de amônio ao sobrenadante a 70% de saturação. O material foi deixado em repouso por 24h a 4°C. Após esse período o líquido metabólico livre de células foi centrifugação a 4000 rpm por 15min. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o biossurfactante extraído foi submetido à diálise com água deionizada por 24h, com trocas a cada 4h para a remoção do sal aderido a amostra. O precipitado foi recolhido e liofilizado de acordo com a metodologia de Navon-Venezia et al. (36).

**3.4.8.2 Carga iônica:** a determinação da carga iônica do biossurfactante foi avaliada pela técnica de difusão dupla em Ágar com baixa viscosidade (solução a 1%). Após distribuição do Agar em placa de Petri, foram feitas 3 fileiras regularmente espaçadas de poços. Posteriormente, os poços das fileiras inferiores foram preenchidas com solução de biossurfactante isolado na concentração de 0,001%. O poço da fileira superior foi preenchido com um composto puro de carga iônica conhecida. A substância aniônica conhecida foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02M e a substância catiônica foi o cloreto de bário a 0,05M. A placa foi mantida

em temperatura ambiente por 48h horas. A leitura foi realizada através do surgimento de linhas de precipitação (33).

**3.4.8.3 Composição química:** o biossurfactante isolado teve índice de proteínas determinado de acordo com o kit Labtest (Brasil), enquanto que os carboidratos foram quantificados de acordo com a metodologia de Dubois et. al. (17), utilizando fenol ácido-sulfúrico. Os lipídios foram determinados após a extração com clorofórmio e metanol (30).

**3.4.8.4 Espectrometria ao raio Infravermelho:** o material obtido foi analisado usando um Espectrômetro infravermelho FT-IR, com transformada de Fourier (FT-IR), registrados em aparelho Bruker IFS 66, utilizando-se pastilhas KBr, sendo os números onda expressos em  $\text{cm}^{-1}$  na região de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

**3.4.8.5 Teste de toxicidade:** o teste de toxicidade do biossurfactante foi realizado com *Artemia salina* baseado na porcentagem de morte do microcrustáceo, em relação ao seu número total (10 larvas), na presença de diferentes concentrações da solução do biossurfactante (v/v de 25%, 50% e 75%), diluídas em 5 ml de uma solução aquosa de sal marinho sintético (33,3g L), incubados por 24h. O volume máximo da amostra teste (solução do biossurfatante) foi de 1,5ml. Em seguida, foi realizada a contagem dos organismos sobreviventes, determinando-se assim a dose limite ( $\text{CL}_{50}$ ) dos líquidos metabólicos. Os testes foram realizados em duplicata (32).

### **3.4.9 Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo**

O teste de biorremoção de óleo queimado de motor foi realizado utilizando solo arenoso, oriundo da praia de Boa Viagem (Recife-PE). O tratamento foi realizado com

o líquido metabólico livre de células, contendo o biossurfactante, por 48 horas e temperatura de 28°C, de acordo com a metodologia de Nitschke e Pastore (37).

### **3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.5.1 Identificação e caracterização da *Candida glabrata* isolada do solos de Serra Talhada (PE)**

O método clássico para identificação de microrganismos consiste na análise da morfologia e do perfil bioquímico, permitindo a diferenciação entre as espécies de leveduras, especialmente as do Gênero *Candida*. No método molecular, a identificação é baseada nas características genotípicas específicas de cada espécie (14). Através da prova de filamentação e clamidoconídeos, em ágar fubá, a levedura isolada foi identificada previamente como *Candida glabrata*, pois segundo Pereira (39), esta espécie de *Candida* é a única que não possui pseudo-filamentos (Figura 1). Na prova de fermentação, observou-se a habilidade da levedura em fermentar apenas a glicose em baixas tensões de oxigênio, devido a mudança do pH e formação de gás no tubo de Durhan, assim como assimilação da peptona, utilizada como controle positivo, na identificação de espécies de *Candida* (Figura1). A análise dos resultados mostrou que a identificação da levedura pelos testes bioquímicos foi verdadeira, pois na análise molecular, utilizando primers específicos (ITS3 e ITS4) houve amplificação de 400pb. O resultado indicou 95 % de identidade para *Candida glabrata* (Figura 2). Segundo Chen et al. (12), um produto de PCR com os primers ITS3/ITS4 amplificam 414 pb para *Candida glabrata*.

### 3.5.2 Produção e caracterização do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* UCP (1556)

No sentido de agregar valor aos rejeitos industriais e minimizar os impactos ambientais causados ao meio ambiente, foi investigada a produção de biossurfactante por *Candida glabrata* utilizando como meio de cultivo a milhocina e o soro de leite. Após 72 horas de cultivo, observou-se a ocorrência da produção máxima de biossurfactante havendo uma significativa redução da tensão superficial da água 70 mN/m para 28,53 mN/m nos pontos centrais do planejamento experimental DCCR (Tabela 3), onde utilizou-se concentrações em níveis intermediários de milhocina e soro de leite.

**3.5.2.1 Produção extracelular do biossurfactante:** segundo Wu e Ju (48), as leveduras caracterizam-se por produzirem biossurfactantes extracelularmente. Porém, alguns microrganismos não conseguem excretar os biossurfactantes os quais permanecem aderidos à célula. A necessidade da determinação da tensão superficial foi atribuída à possível aderência dos biossurfactantes nas células. Neste contexto, a condição selecionada do planejamento experimental, foi submetida a novas determinações de tensão superficial nas seguintes condições: líquido metabólico com células de *C. glabrata*, líquido metabólico livre de células e líquido metabólico livre de células após extração do biossurfactante de acordo com Santos (44). Os valores de tensão superficial permaneceram iguais para o líquido metabólico contendo células de *C. glabrata* e para o líquido metabólico livre de células comprovando desta forma, que a remoção das células não tem relação com a remoção do biossurfactante, indicando que a produção foi extracelular. Santos (44) comprovou que após a extração do biossurfactante houve um aumento dos valores da tensão superficial do líquido metabólico livre de células, indicando a eficiência do processo de isolamento do biossurfactante. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Santos (44) devido o aumento da tensão superficial do meio de produção após a

extração do biossurfactante de 28,53 mN/m (antes da extração) para 50,06 mN/m (após a extração) (Figura 3). O máximo acúmulo do biossurfactante produzido por *C. glabrata*, ocorreu no final da fase exponencial (Figura 4). Estes dados estão de acordo com Gerorgiou et al. (22), confirmando que a maioria dos biossurfactantes são liberados no meio de cultura na fase exponencial de crescimento do microrganismo. Segundo Ron e Rosemberg (42), o efeito da redução da tensão superficial está diretamente relacionado a concentração da solução do biossurfactante até atingir valores da CMC. A Figura 5 ilustra a CMC do biossurfactante produzido pela *C. glabrata* alcançado na concentração de 1%. A partir desta concentração do biossurfactante em solução, não houve maiores reduções na tensão superficial da água, permanecendo em torno de 28,00 mN/m, indicando que a CMC havia sido atingida nesta concentração. O biossurfactante de *C. glabrata* demonstrou maior capacidade de reduzir a tensão do que os surfactantes de *C. antarctica* (35mN/m) e de *Yarrowia lipolytica* (50mN/m) (2,3).

**3.5.2.2 Influência da fonte de carbono e nitrogênio:** para obtenção da alta produção de biossurfactantes, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de definir a melhor relação entre as fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo (1). Neste sentido, vários estudos demonstram a influência das fontes de carbono e nitrogênio no meio de produção, sendo considerados parâmetros importantes na produção de biossurfactantes. A produção dos biossurfactantes pode ser influenciada pelo tipo e concentração do substrato empregado, podendo aumentar ou reduzir a síntese do biopolímero, e até mesmo modificá-lo estruturalmente. Assim, inúmeras alternativas vêm sendo descritas pela literatura como fontes de carbono e nitrogênio, desde fontes hidrofílicas (como glicose, lactose, etc) até hidrofóbicas (óleo de soja, hexadecano, etc). As leveduras, mesmo aquelas da mesma espécie, apresentam respostas diferentes à produção de biossurfactante frente aos diversos meios de cultivo (27, 20,



45, 5, 28, 4). Pesquisas realizadas por Guimarães (24) demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, glicerina ou etanol. A fonte de carbono determina o tipo e as propriedades dos biossurfactantes, enquanto a fonte de nitrogênio influencia diretamente no crescimento celular (19). Entretanto, neste trabalho utilizou-se o soro de leite, efluente rico em lactose, em concentrações de níveis intermediários (20%), assim como a milhocina, efluente rico em aminoácidos, também em concentrações de níveis intermediários (3%). Os dados obtidos estão de acordo com Fontes et. al. (19), comprovando a habilidade dos microrganismos em utilizar como fonte de carbono, os carboidratos e como fonte de nitrogênio a milhocina. Portanto, sugere-se que a *Candida glabrata* foi capaz de usar como nutriente o soro de leite, provavelmente como fonte de carbono, por ser um efluente rico em lactose (carboidratos) e a milhocina como fonte de nitrogênio devido sua alta composição em aminoácidos. Segundo Carlile e Watkison (9), um meio balanceado pode conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Essa relação 10:1 garante um alto conteúdo protéico, enquanto uma relação maior 50:1 favorece a acumulação de metabólitos secundários derivados de lipídios ou polissacarídeos extracelulares. Desta forma, com base na concentração proposta por Carlile e Watkison (9) para a relação C:N, foi utilizado neste trabalho uma provável proporção de 10:1,5 (carboidrato do soro de leite: aminoácidos da milhocina), sugerindo que as mesmas atingiram um correto balanço nutricional e indução da produção do biossurfactante, evidenciado pela redução da tensão superficial.

**3.5.2.3 Propriedade emulsificante do biossurfactante:** os bioemulsificantes são surfactantes que apresentam capacidade de formar e estabilizar emulsões (49). Neste contexto, foi determinado o índice de emulsificação, teste quantitativo, para avaliar a

ocorrência da formação e estabilização de emulsões. Após 24 horas, observou-se a estabilização de emulsões em todas as condições, havendo resultado significativo nos pontos centrais do planejamento experimental (DCCR), com valores em torno de 88%, utilizando como substrato hidrofóbico o óleo queimado de motor. Estes resultados demonstram que o biossurfactante produzido apresenta significativas propriedades emulsificantes, uma vez que Willumsen e Karlson (49) consideram valores significativos acima de 50% de emulsificação. Os melhores resultados referentes à atividade de emulsificação foram obtidos utilizando óleo de soja nos pontos centrais do planejamento experimental como mostra a Tabela 3. Luna, et al. (29) produziram biossurfactante por *Candida glabrata* UCP (1002) em meio contendo óleo de algodão, glicose e extrato de levedura, obtendo redução da tensão superficial do meio de 56 mN/M para 31 mN/m. Contudo, resultados mais eficientes foram observados neste trabalho com o biossurfactante produzido por *C. glabrata* UCP (1556), onde ocorreu uma redução da tensão superficial de 50,06 para 28,53 mN/m, utilizando a formulação de um novo meio de produção de baixo custo, empregando rejeitos industriais. A conversão de resíduos para insumos, representam um novo fluxo de produtos para o âmbito industrial, com o diferencial de serem produtos descartados em certas atividades e transformados em matéria-prima (8).

**3.5.2.4 Estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida glabrata*:** o biossurfactante produzido por *Candida glabrata*, selecionado na melhor condição do planejamento, foi avaliado no líquido metabólico livre de células quanto a sua estabilidade em diferentes condições, tais como: diferentes pHs, concentrações de NaCl e temperaturas de acordo com a determinação da tensão superficial. O biossurfactante selecionado mostrou estabilidade em todas as concentrações de NaCl testadas (2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%) indicando sua possível aplicação em ambientes aquáticos, pois independente da concentração de NaCl utilizada, o

biossurfactante permanece eficiente na redução da tensão superficial (Figura 6). A ocorrência de valores significativos para tensão superficial foi observado apenas em pH 4. Com relação à influência da temperatura e demais pHs, sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células, contendo o biossurfactante (Figura 6), observou-se que houve uma variação na estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida glabrata*. Andrade et.al., (4), demonstraram que o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*, demonstrou efetiva estabilidade, sobre o índice de emulsificação, em temperaturas elevadas.

**3.5.2.5 Composição química do biossurfactante selecionado:** o biossurfactante produzido por *Candida glabrata* é constituído por 35% de lipídeos, 30% de proteínas e 22,9% de carboidratos. A quantificação orgânica do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* em meio composto por manipueira, sulfato de amônio e uréia, apresentou em sua composição maiores valores para carboidratos e menores para proteínas e lipídeos (4). Por outro lado, em estudos conduzidos por Rufino et. al (43), o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* utilizando resíduo industrial apresentou em sua composição maiores valores para proteínas (50%) e menores para lipídeos (20%) e carboidratos (8%) (43). Os dados obtidos estão de acordo com Muthusamy et. al. (35), comprovando que o tipo e propriedade do biossurfactante dependem da matéria prima utilizada no meio de cultivo como fonte de carbono.

**3.5.2.6 Carga iônica do biossurfactante:** de acordo com o teste de difusão dupla em ágar, observou-se o surgimento de linhas de precipitação entre o biossurfactante produzido por *C. glabrata* e o composto iônico Dodecil Sulfato de Sódio indicando o caráter aniônico do biossurfactante. Segundo Barbieri (7), os surfactantes aniônicos mais utilizados comercialmente subdividem-se em carboxilatos e ésteres sulfatados amplamente utilizados em produtos de limpeza domésticos e industriais.

**3.5.2.7 Caracterização por espectrometria no infravermelho:** através da espectrometria no infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FT-IR) foi quantificado o biossurfactante, observando-se a presença do radical carbonila com ligações do tipo éster (Figura 7). Os dados obtidos estão de acordo com Gartshore e Cooper, (21), devido a presença, na maioria dos biossurfactantes, de um radical carbonila, ligação éster ou ácido carboxílico os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético.

**3.5.2.8 Toxicidade do biossurfactante:** o teste de toxicidade e atividade antimicrobiana foi realizado em diferentes concentrações do biossurfactante (0,001% e 1%). Segundo análise feita para toxicidade, observou-se que o biossurfactante a 0,001% não apresentou toxicidade. Quando aumento-se a concentração para 1% o biossurfactante apresentou toxicidade em todas as condições testadas. Estes dados indicam que o biossurfactante produzido por *C. glabrata* pode ser utilizado em baixas concentrações em ambientes aquáticos.

**3.5.2.9 Validação estatística dos resultados da produção do biossurfactante por *Candida glabrata* UCP 1556:** todos os termos do modelo foram considerados significativos em nível de confiança dentro dos 5% ( $p < 0,05$ ). O reduzido valor para o erro puro e do erro experimental demonstram um grande domínio sobre a técnica de medida da variável resposta tensão superficial, reforçando a validade da utilização do DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), uma vez que este método não utiliza repetições para os pontos que não estejam no centro da estrela configuração dos pontos. Um erro experimental pequeno, em relação a falta de ajuste, leva a um coeficiente de regressão considerável  $R = 0,94956$ , ajuste este que pode ser constatado na Tabela 4. Para definir as condições otimizadas utilizando um

planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional, o domínio da técnica foi um ponto essencial, uma vez que a região de condições otimizadas está numa faixa estreita de valores das variáveis independentes (Figura 8). O modelo quadrático obtido está representado por  $Y = 102,339 - 16,241 * [X1] + 3,606 * [X1]^2 - 4,792 * [X2] + 0,129 * [X2]^2 - 0,235 * [X1]*[X2]$ . O pouco caráter paralelo entre as curvas de nível demonstrou uma considerável interação entre os fatores, invalidando a explicação do fenômeno utilizando apenas um único fator (Figura 9). Observa-se no Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, representados pelo valor de p, que todas as variáveis independentes como o soro de leite e a milhocina, tanto na função quadrática (Q) como na linear (L), assim como sua associação, influenciaram na tensão superficial, sendo a milhocina (Q) a variável independente mais relevante, por estarem acima dos valores de p. O sinal positivo desta variável significa que em menores concentrações de milhocina, obtem-se valores mais baixos de tensão superficial. O sinal negativo referente ao soro de leite (L) e a associação do soro de leite com a milhocina (ambos em função linear), significa que quando esta variável passa de um nível de -1 para +1 a variável resposta tensão superficial é reduzida (Figura 11).

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

O biossurfactante isolado de *Candida glabrata*, na melhor condição do planejamento, foi aplicado em solo arenoso, oriundo de Boa Viagem (PE), contaminado com óleo motor queimado, de acordo com a metodologia de Nitschke e Pastore (37). O resultado de biorremoção apresentou valores significativos sobre a remoção do óleo queimado de motor em areia, obtendo 95,77% de remoção. Em estudos realizados por Andrade et.al. (4), o líquido metabólico contendo o

biossurfactante em contato intermitente com células de *C. lipolytica* foi capaz de remover 81,7% de óleo pesado em solo.

### **3.6 AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE) e Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Estamos gratos ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) laboratórios, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abouseoud, M., Maach, R., Amrane, A.** 2007. Biosurfactants production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. Trends in Applied Microbiology, 340-347.
2. **Adamczak, M. e Bednarski, W.** 2000. Influence of medium composition and aerations on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. Biotechnology Letters, **22**:313-316.
3. **Amaral, P.F.F., Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.V., Coelho, M.A.Z; Marrucho, I.M; Coutinho, J.A.P.** 2006. Produced and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, **41**:1894-1898.
4. **Andrade, R. F. S. ; Luna, J. M. ; Rufino, R.D., Albuquerque, C.D., Sarubbo, L. A., Takaki, G. M. C.** 2009. Surface active agent produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, **1**: 701-705p.
5. **Antunes, A. A.; Silva, M. L. R. B.; Silva, C. A. A., Campos-Takaki, G. M.** 2006. Characterization of *Chromobacterium violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Suplemento especial, n. 1, p. 48-55.
6. **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.

7. **Barbieri, E., Ngan, P. V., Gomes, V.** 2000. Efeito do LAS-C12 no metabolismo de rotinade tainhas em função da temperatura em três salinidades. In: Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI.
8. **Bieger, A. e Rinaldi, R.N.** 2009. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: Sober 47 congresso: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Porto Alegre, p. 1-14.
9. **Calile, M. e Watkison, S.C.**1997. The fungi. Academic press, p.460.
10. **Camargo, F. P., Alves, I. A. , PARLOW, M. S., GOULART, L. S.** 2008. Isolamento de *Candida sp.* da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço público de ginecologia do município de Santo Ângelo – RS. NewsLab, n. 87, p. 96-104.
11. **Cerqueira, V.S. e Costa, J.A.** 2009. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. Química Nova, **32**: p.
12. **Chen, Y. C. et al.** 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol, 38: 2302-2310.
13. **Cirigliano, M. C. e Carman, G. M.**1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and environmental Microbiology, **48**: 747-750.
14. **Claudino, A.L.R.** 2007. Caracterização de isolados de *Candida spp* de cavidade bucal quanto aos aspectos fenotípicos e moleculares e obtenção de mutantes heteroresistentes á antotericina B e fluconazol. 80p. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Alfena, Minas Gerais.



- 15. Cooper, D. G., Goldenberg, B. G.** 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species Applied and environmental Microbiology, **53**: 224 –229.
- 16. Costa, S.G.V.A., Nitschke, M., Conteiro, J.** 2008. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. Ciência e Tecnologia de Alimentos, **28**: 34-38.
- 17. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.,** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. **29**, 350–356.
- 18. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA.** Manual de métodos de análises de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.
- 19. Fontes, G.C.F., Amaral, P.F.F., Coelho, M.A.C.** 2008. Produção de biosurfactante por levedura. Química Nova, **31**: 8
- 20. Gallardo M.E., Ferrandez A., Lorenzo, V., Garcia, J.L., Diaz, E.** 1997. Desidning recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. J. Bacteriol, **179**: 7156-7160.
- 21. Gartshore J.D., Lim, Y.C., Cooper D.G.** 2000. Quantitative analysis of biosurfactants using FT-IR spectroscopy. Biotechnology Letters, **22**: 169-172.
- 22. Georgiou, G., Lin S.; Sharma, M. M.** 1992. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technology. 10**: 60-65.

- 23. Gonçalves, F. A . G.** 2007. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. 67 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG.
- 24. Guimarães, L. M.** 2005. Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis*, 207 p. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 25. Kurtzman, C. P., and Fell, J. W.** 2000. The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam.
- 26. Kuyukina, M. S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M. I.** 2001. recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. Journal of Microbiological Methods. **46**: 109-120.
- 27. Lee, M.K., Senius, J.D., Grossman, M.J.** 1995. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. Applied Environmental Microbiology, **61**:4362-4366.
- 28. Li, F., Zhang, Z., Feng, J., Cai, X., Xu, P.** 2007. Biodesulfurization of FENANTRENO in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. **Journal of Biotechnology**, **127**: .222-228.
- 29. Luna, J. M., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G. M.** 2009. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. Braz. arch. biol. Technol, **52**:785-793.

- 30. Manocha, M. S., San- Blas. G., Centeno.** 1980. S. lipid composition of paracciodioids brasilienses: Possible correlation witer virulence of different strains. Journal of General Microbioly. Condon, **177**:147-154.
- 31. Marçal, V.V.M.** 2005. Isolamento e caracterização morfogênética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos, 2005 99p. Dissertação Mestrado- Universidade Estadual de Londrina, Paraná.
- 32. Mc Laughlin, J. L., Saizarbitoria, T. C., Anerson, J. E.** 1985. Três bioensayos simples para químicos de produtos naturales. Revista De La sociedad venezolana de química, **18**:13-18
- 33. Meylheuc,T., van oss,C.J., Bellon-Fontaine, M.M.** 2001. Adsorption of biosurfactants on soil surfaces and consequences regarding the bioahesion of *Listeria monocytogenes* LO28. Journal of Apllied Microbioogy, **91**:.822-832.
- 34. Montgomery, D. C.; Bettencourt JR, V. M.** 1997. Multiple response surface methods in computer simulation. SIMULATION, **29**: 113 – 121.
- 35. Muthusamy, K.; Gopalakrishnan, S.; Kochupappy, T.; Sivachidambaram, P.** 2008. Biosurfacts: properties, commercial production and application, Current science, **94**: 736-747.
- 36. Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R.; Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Applied and Environmental Microbiology. **61**: 3240-3244.

- 37. Nitschke, M., Pastore, G. M.** 2002. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Quimica Nova*, **25**: 772-776.
- 38. Osamu Y., Yoshitaka, I., Ken-Ichi, K., Takashi, O., Yoshikazu, I. AND Kenji, M.** 2002. Enhancement and stabilization of desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by feeding ethanol and sulfur components. *Journal of bioscience and bioengineering*, **94**: 447-452
- 39. Pereira, C.M.** 2002. Quantificação e identificação de *Candida* sp na saliva de pacientes hemofílicos, 2002, 123p. Dissertação Mestrado- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- 40. Pereira, M.; Parente, J.A.; Bataus, D.D.P.C.; Soares, R.B.A. Soares,C.M.A.** 2004. Chemotaxis and Flagelar genes of *Chromobacterium violaceum*, **Genetics and Molecular Research**, **1**: 92-101.
- 41. Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., Soriano, A. U., Santos, R. L. C., Sobral, L. G. S.**2006. Série Tecnologia Ambiental, STA-37, CETEM/MCT.
- 42. Ron, E. Z. e Rosenberg, E.** 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology.*, **13**: 249-252.
- 43. Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campo-Takaki, G.M.** 2007. Enhanced of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *Word J. Microbiol. Boitechnol.* **23**: 734-741

- 44. Santos, C.F.C.** 1997. Seleção de linhagem de levedura produtora de biosurfactante e estudo fermentativo para sua produção, 1997, 134p. Tese doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- 45. Silveira, M.M.; Wisbeck E.; Hoch, I.; Jonas, R.** 2001. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**: 442-445.
- 46. Statsoft, Inc.** 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponível em [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Acesso em 21/03/2009, 20:30:30
- 47. Valduga, E.; Mazur, S. P.; Finzer, J. R. D.** 2006. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. *Alimentos e Nutrição*, **17**:393-400.
- 48. Wu, J., Ju, L.K.**1998. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, **59**:193-202.
- 49. Willumsen, P. A. e Karlson, U.** 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. *Biodegradation*, **7**: 415 – 423.

**Tabela 1** - Níveis e fatores do DCCR aplicado

<b>Fator</b>	<b>-1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
Milhocina (%)	12,95	15	20	25	27,05
Soro de leite (%)	1,59	2	3	4	4,41

**Tabela 2**- Matriz de planejamento codificada para o DCCR aplicado do planejamento experimental de 2<sup>2</sup>

<b>Condições</b>	<b>Milhocina</b>	<b>Soro de leite</b>
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

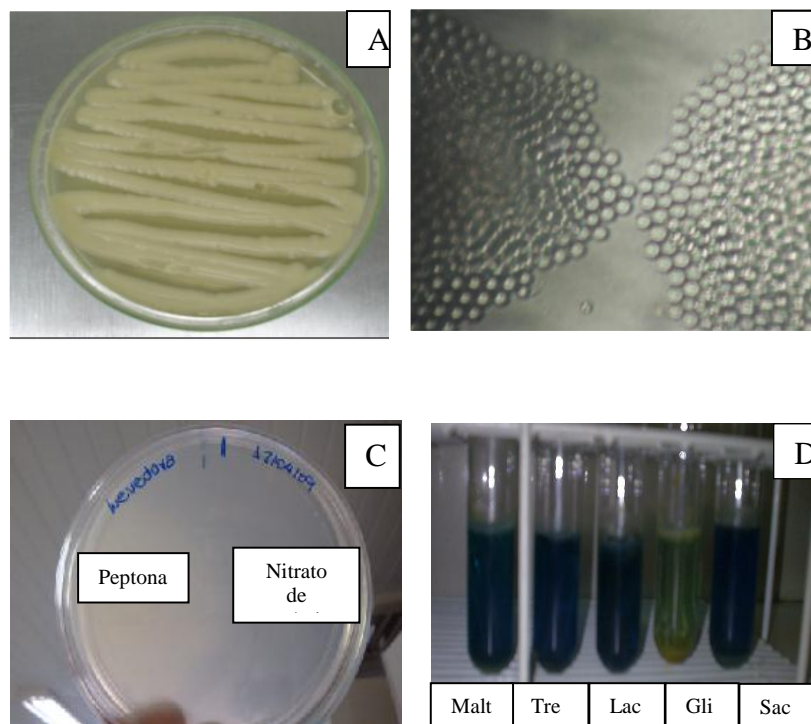
**Tabela 3** – Resultado do processo fermentativo de *Candida glabrata* utilizando planejamento experimental (DCCR) de  $2^2$  com 4 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo, tendo como variável resposta a tensão superficial, índice e atividade de emulsificação e pH

Condições	Tensão Superficial (mN/m)	Índice de	Atividade de	pH
		emulsificação -E <sub>24</sub> óleo queimado de motor (%)	emulsificação Óleo de soja (UAE/mL)	
1	36,87	33,33	2,63	5,78
2	39,15	40,00	1,53	4,73
3	33,76	33,33	2,52	5,92
4	31,33	30,00	2,68	5,60
5	32,44	37,50	2,61	5,41
6	36,45	40,00	2,56	4,60
7	34,97	80,00	2,03	5,48
8	32,43	33,33	2,39	5,23
9	28,63	85,33	2,87	5,98
10	28,53	88,88	2,81	6,01
11	28,63	87,50	2,88	6,07
12	28,94	87,71	2,98	5,91

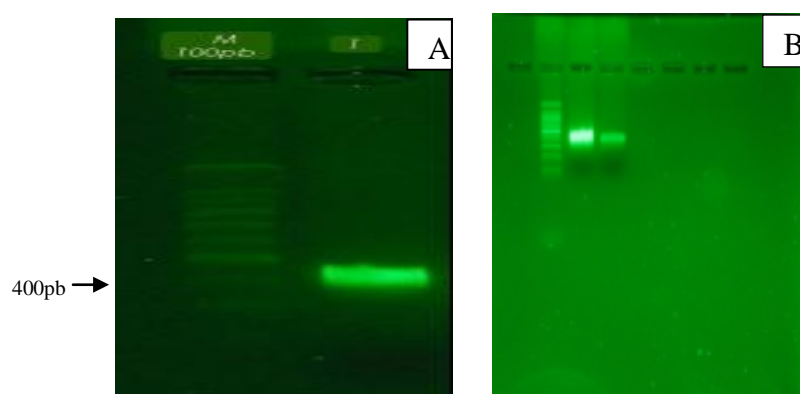
**Tabela 4** – Análise de variância dos dados experimentais para a tensão superficial

<b>Efeito</b>	<b>Soma quadrático a</b>	<b>Graus de liberdade e</b>	<b>Média quadrático a</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(x1) mllhocina (L)	3, 7712	1	3, 77124	187, 003	0,000846
Milhocina (Q)	83, 2322	1	83, 23225	4127, 219	0,000008
(x2) Soro de leite (L)	21,11079	1	21, 10795	1046, 675	0,000065
Soro de leite (Q)	66,9257	1	66, 92569	3318, 629	0,000012
1L x 2L	5,5460	1	5, 54603	275, 010	0,000477
Falta de ajuste	16, 9226	3	5, 64086	279, 712	0,000361
Erro puro	0, 0605	3	0, 02017		
Total	172, 7249	11			

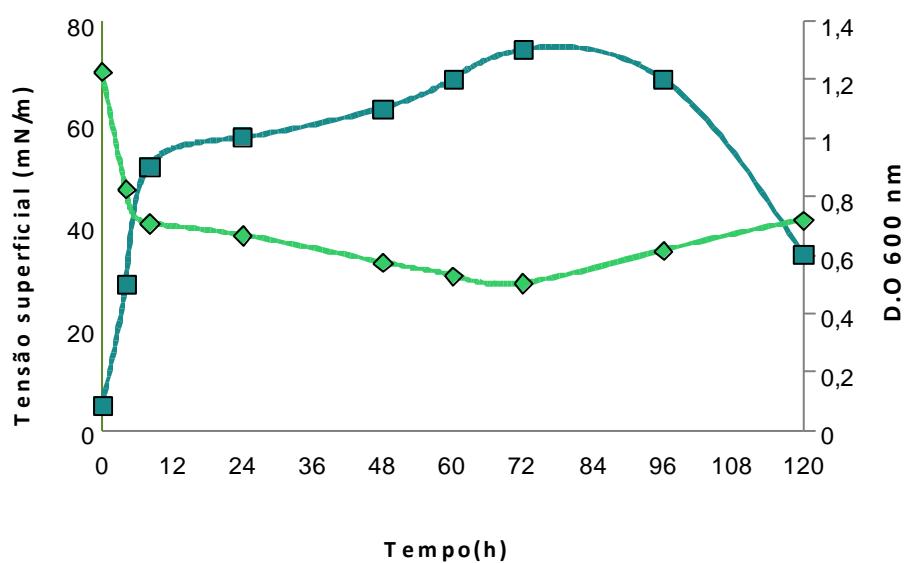




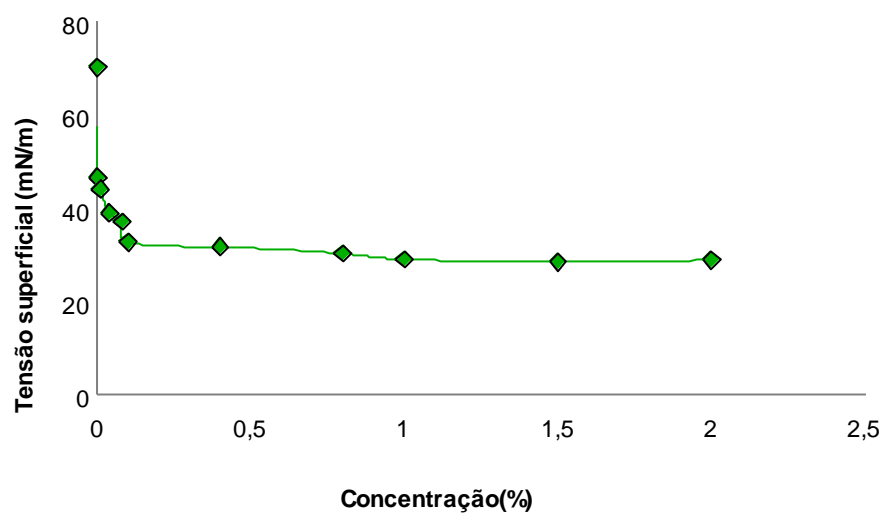
**Figura 1-** Identificação através de métodos morfológicos e bioquímicos de *Candida glabrata* isolada do solo do semi-árido-PE. (A) Identificação morfológica macroscópica; (B) Identificação morfológica microscópica em ágar fubá; (C) Assimilação de fontes nitrogenadas e (D) Fermentação de açúcares.



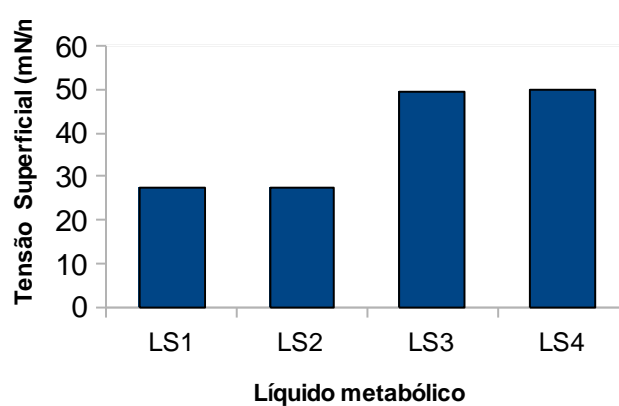
**Figura 2-** Eletroforese em gel de agarose após Reação de cadeia Polimerase PCR. (A) Amplificação do DNA de *Candida glabrata* utilizando Primes ITS1 e ITS2 e (B) Purificação do DNA de *Candida glabrata* isolada do semi-árido (PE)



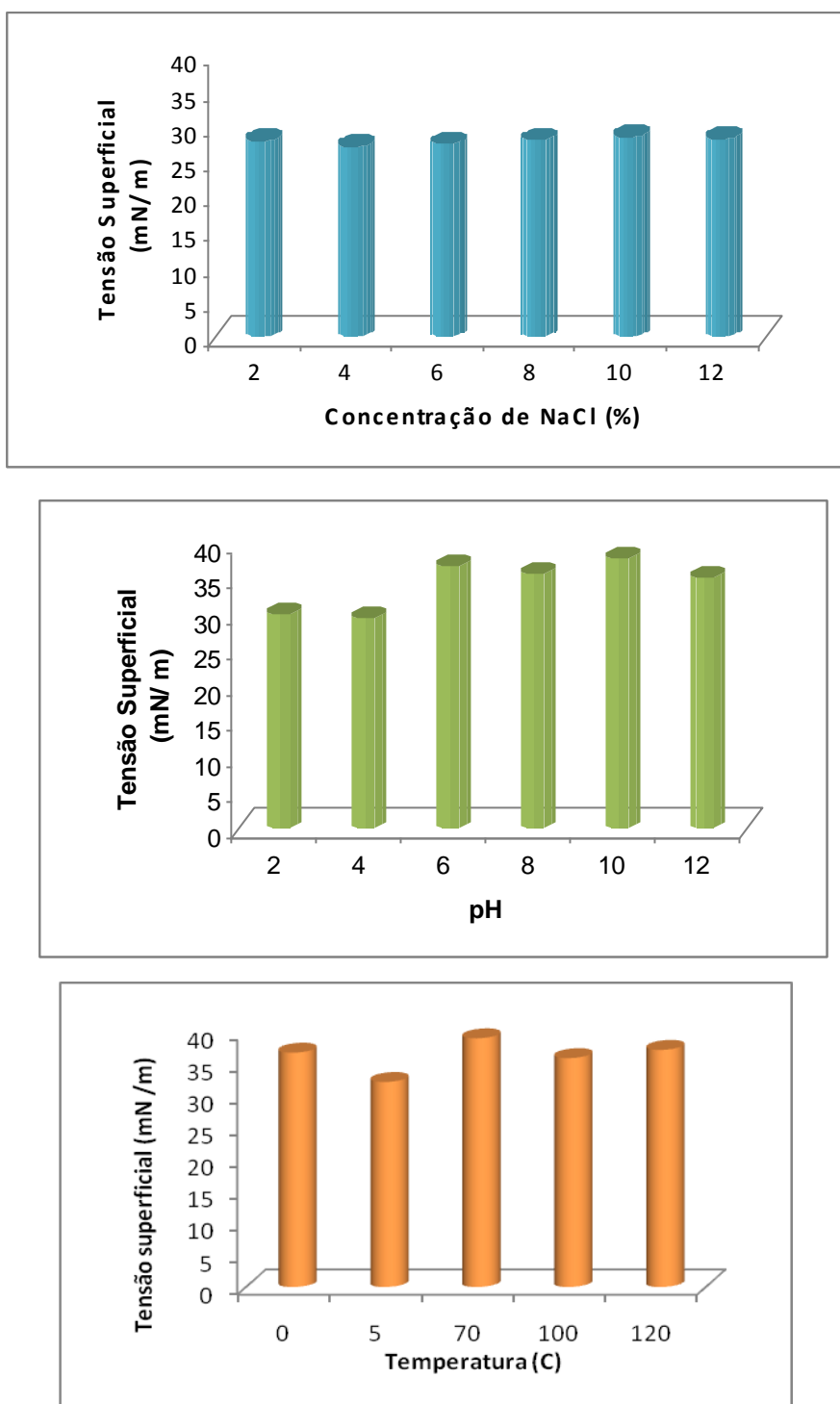
**Figura 3-** Curva de crescimento e tensão superficial do biossurfactante produzido por *Candida glabrata*, isolada do semi-árido (PE), em meio de produção constituído por rejeitos industriais milhocina e soro de leite após 72 horas de fermentação.



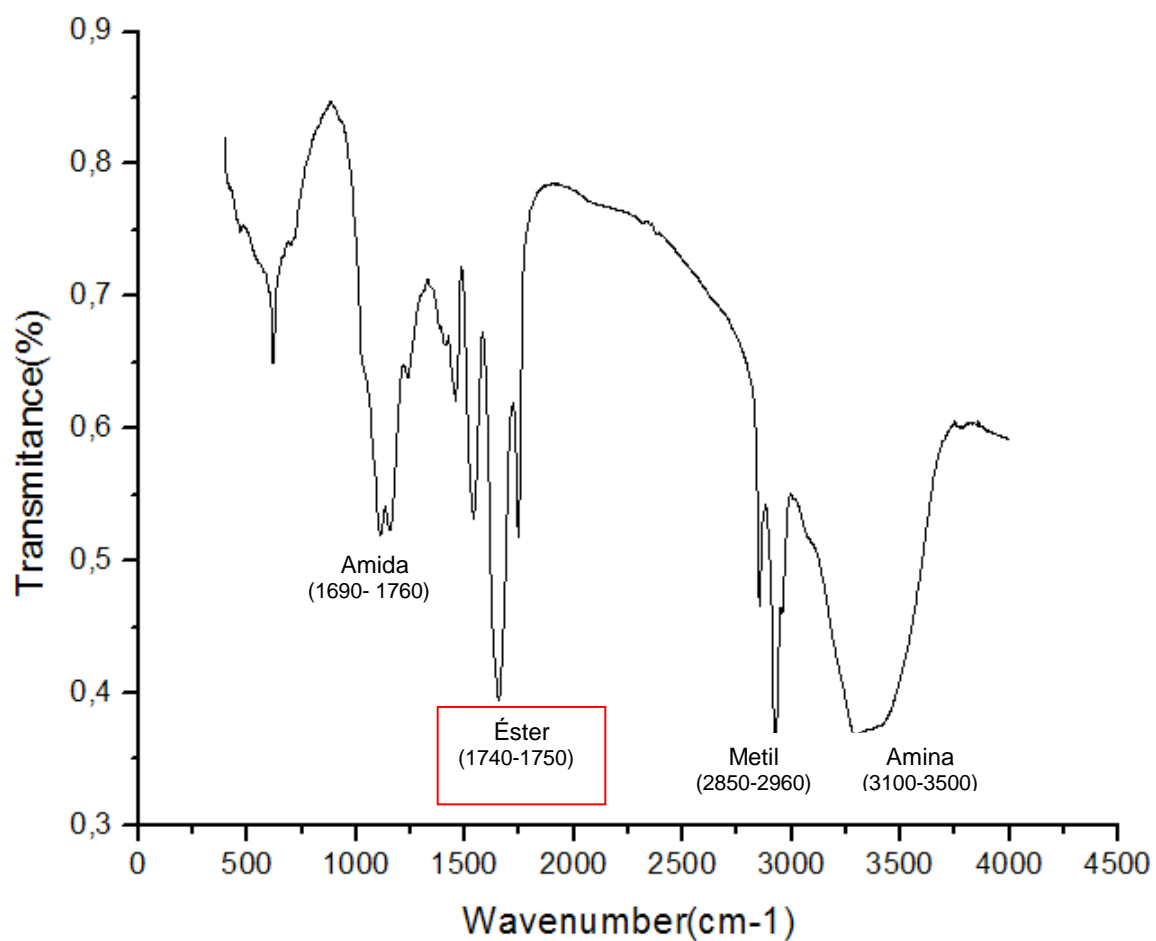
**Figura 4-** Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* após 72 horas de cultivo em meio composto por rejeitos industriais



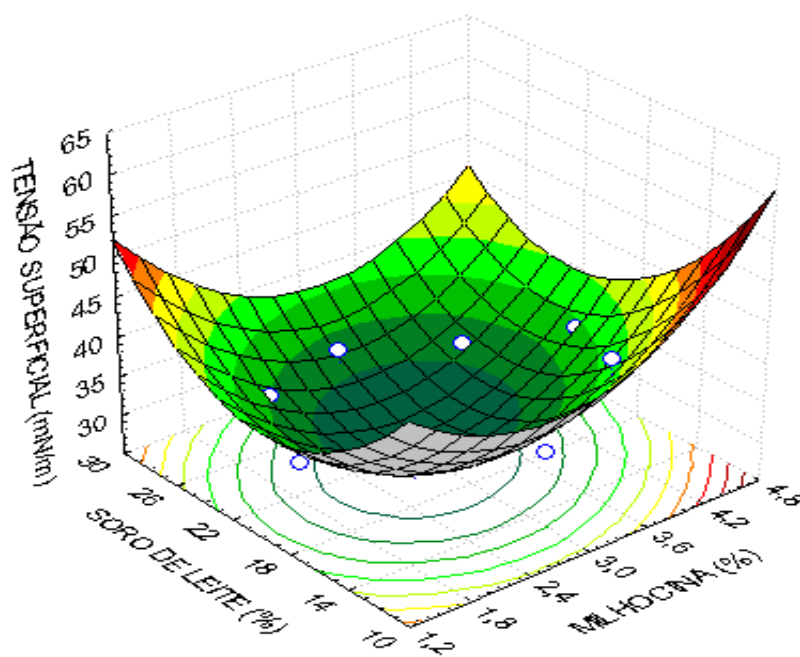
**Figura 5-** Comprovação da produção extracelular do biossurfactante produzido por *C. glabrata* através da tensão superficial do líquido metabólico, da condição selecionada do planejamento, em diferentes condições. LS1 (líquido metabólico com células de *Candida glabrata*), LS2 (líquido metabólico livre de células), LS3 (líquido metabólico após extração do biossurfactante) e LS4 (controle).



**Figura 6** - Estabilidade do biossurfactante determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida glabrata*. (A) diferentes valores de pH; (B) diferentes concentrações de NaCl e (C) diferentes temperaturas.

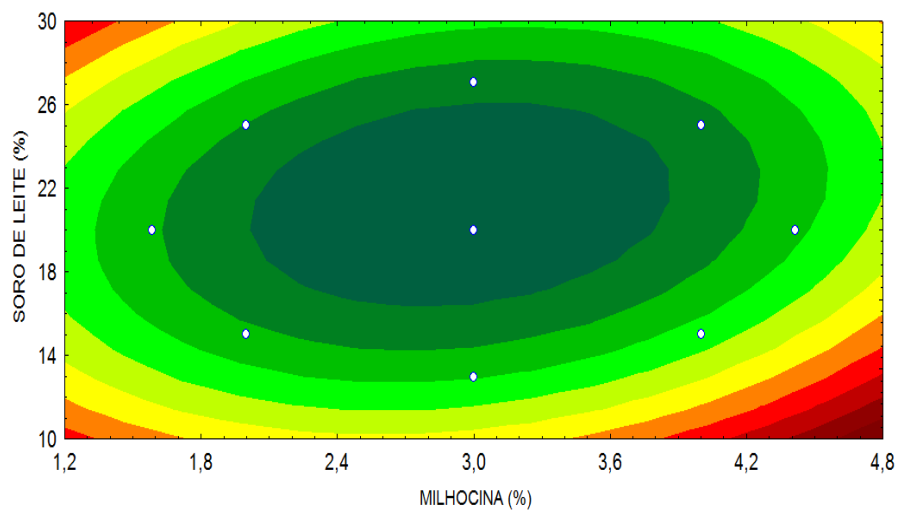


**Figura 7** - Espectrometria ao raio infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FT-IR) do biossurfactante isolado de *C. glabrata*

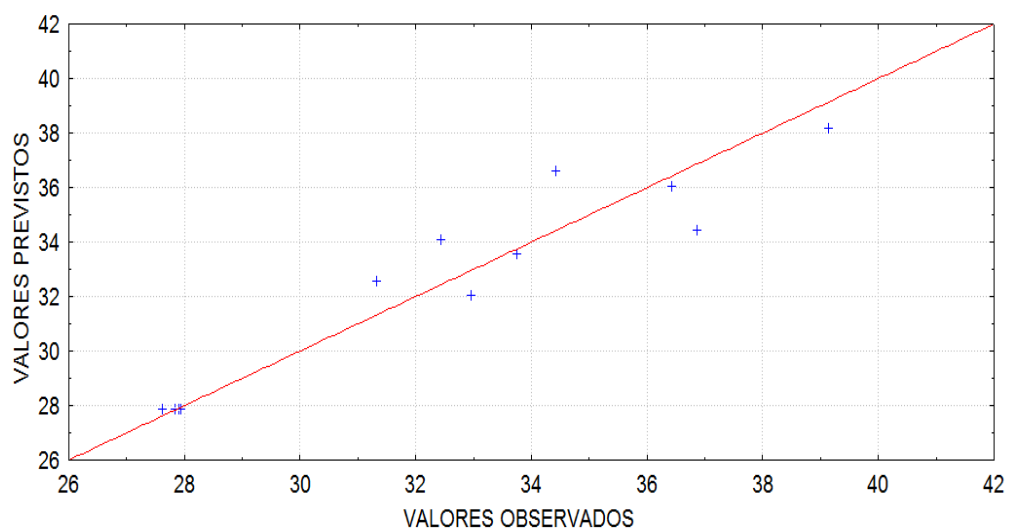


**Figura 8-** Superfície de resposta da produção de biossurfactante produzido por *C. glabrata* UCP (1556) formulado por diferentes concentrações de soro de leite e milhocina determinado pela tensão superficial.

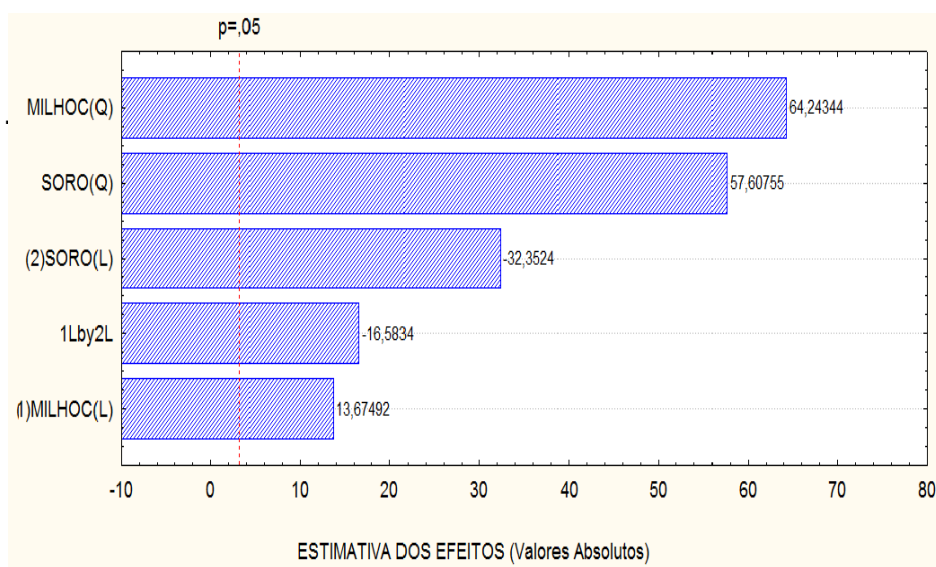




**Figura 9**– Curvas de contorno na produção de biossurfactante produzido por *C. glabrata* UCP (1556) formulado por diferentes concentrações de soro de leite e milhocina determinado pela tensão superficial.



**Figura 10-** Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial do biosurfactante produzido por *Candida glabrata* com 72 horas de cultivo



**Figura 11** – Efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *Candida glabrata* com 72 horas de cultivo

## CONCLUSÕES GERAIS

A partir do estudo da produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* e *Candida glabrata* conclui-se:

### Artigo I

*Candida lipolytica* UCP 0988 apresenta habilidade de crescer e produzir biossurfactante em meio contendo manipueira como substrato;

Através do cultivo de *Candida lipolytica* em meio constituído por manipueira, sulfato de amónio e ureia após 96 horas de fermentação, ocorre a produção máxima de biossurfactante com excelente redução da tensão superficial;

O biossurfactante produzido pela *C. lipolytica* propicia a formação e estabilização das emulsões indicando sua propriedade emulsificante;

*Candida lipolytica* produz biossurfactante com alta estabilidade térmica;

O biossurfactante de *C. lipolytica* foi caracterizado como polimérico devido a alta constituição em carboidratos, proteínas e lipídeos;

*Candida lipolytica* produz biossurfactante com alto potencial de uso em processos de biorremediação demonstrada pela remoção do óleo queimado de motor em solo;

## Artigo II

A linhagem selvagem de *Candida glabrata* (UCP 1556), isolada de solos do semi-árido (PE, Brasil), apresenta elevado potencial na produção de biossurfactante;

A formulação do novo meio de produção de biossurfactante, constituído pelos rejeitos industriais, milhocina e soro de leite, possui adequado balanço dos nutrientes, formando provavelmente, uma relação ideal entre as fontes de carbono e nitrogênio;

O biossurfactante produzido por *C. glabrata*, propiciou a formação e estabilização das emulsões indicando sua propriedade emulsificante;

O biossurfactante produzido por *C. glabrata* foi caracterizado como complexo polimérico devido à presença de lipídeos, proteínas e carboidratos;

*Candida glabrata* (1556) produz, em meio formulado por soro de leite e milhocina, biossurfactante extracelular do tipo aniônico;

O biossurfactante de *C. glabrata* demonstra efetiva estabilidade em altas e baixas concentrações de NaCl;

O planejamento experimental do tipo DCCR apresentou-se como uma ferramenta muito útil e aplicável para determinar o comportamento das variáveis independentes milhocina e soro de leite sobre a variável resposta tensão superficial, fornecendo condições otimizadas para a produção do biossurfactante;

O modelo obtido pode ser utilizado para previsão do fenômeno na faixa de valores das variáveis independentes utilizadas;

Os biossurfactantes produzidos apresentam potencial de aplicação em processos de biorremediação devido à eficiência na remoção do óleo queimado de motor em solo arenoso.

## 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 es-

tablished 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

\*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/fora.dtl>.

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 there-

fore 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 ac-

count, 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 con-

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 sub-

scription 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](mailto: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](mailto: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](mailto: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 (×) 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 8½ 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 sa-



lient 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 pub-

lished 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,<sup>AL</sup> 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 C<sub>1</sub> 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.

- 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.}
- 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>.
- Smith, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman.** 2001. Polar residues drive association of polyoleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:2250–2255. doi:10.1073/pnas.041593698.
- 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. McNerney, 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 [non-critical] 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 Journals Department 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](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](mailto: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. White space 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:  $3\frac{5}{16}$  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:  $9\frac{1}{16}$  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](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 ( $\mu$  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<sup>4</sup> 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 pre-

TABLE 1. Distribution of protein and ATPase in fractions of dialyzed membranes<sup>a</sup>

Membrane	Fraction	ATPase	
		U/mg of protein	Total U
Control	Depleted membrane	0.036	2.3
	Concentrated supernatant	0.134	4.82
E1 treated	Depleted membrane	0.034	1.98
	Concentrated supernatant	0.11	4.6

<sup>a</sup> Specific activities of ATPase of nondepleted membranes from control and treated bacteria were 0.21 and 0.20, respectively.

sentation 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 STRENDA 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, *S. 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/cadreconr/salmoms/WKLM\\_2007.pdf](http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreconr/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](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 Stack-

ebrandt 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 (<ftp://ftp.fao.org/es/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<sup>+</sup>), and, when necessary for clarity, negative superscripts (Pol<sup>-</sup>) can be used to designate mutant characteristics. Lowercase superscript letters may be used to further delineate phenotypes (e.g., Str<sup>r</sup> 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*<sup>+</sup> *his*<sup>+</sup>). A superscript minus is not used to indicate a mutant locus; thus, one refers to an *ara* mutant rather than an *ara*<sup>-</sup> 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., *his*<sub>*E. coli*</sub> or *his*<sub>K-12</sub> 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 *glnAp*<sub>1</sub> and *glnAp*<sub>2</sub>. 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(*rmD-rmE*)*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<sup>-</sup>), ΔMu cts, or *mal*::ΔMu 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 pa-

rentheses. To indicate the presence of an episome, parentheses (or brackets) are used ( $\lambda$ ,  $F^+$ ). 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*<sup>+</sup>).

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](mailto: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  $\lambda$  might be designated  $\lambda$  Aam11 *int2 red114 cI857*; this strain carries mutations in genes *cI*, *int*, and *red* and an amber-suppressible (*am*) mutation in gene *A*. A strain designated  $\lambda$  *att*<sup>434</sup> *imm*<sup>21</sup> would represent a hybrid of phage  $\lambda$  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  $\lambda$  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 GTP, 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<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized); NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced); NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced); NADP<sup>+</sup> (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)amino-methane]; DEAE (diethylaminoethyl); EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid); EGTA [ethylene glycol-bis ( $\beta$ -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)	SE (standard error)
approx (approximately)	SEM (standard error of the mean)
avg (average)	
concn (concentration)	sp act (specific activity)
diam (diameter)	sp gr (specific gravity)
expt (experiment)	temp (temperature)
exptl (experimental)	tr (trace)
ht (height)	vol (volume)
mo (month)	vs (versus)
mol wt (molecular weight)	wk (week)
no. (number)	wt (weight)
prepn (preparation)	yr (year)
SD (standard deviation)	

### Reporting Numerical Data

Standard metric units are used for reporting length, weight, and volume. For these units and for molarity, use the prefixes m,  $\mu$ , 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 m $\mu$  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  $\mu$ g or 10 min. For example, “pmol/min” is preferable to “nmol/10 min,” and “ $\mu$ mol/g” is preferable to “nmol/ $\mu$ g.” It is also preferable that an unambiguous form, such as exponential notation, be used; for example, “ $\mu$ mol g $^{-1}$  min $^{-1}$ ” is preferable to “ $\mu$ 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:  $E_0$ ,  $E_h$ ,  $M_r$ ,  $K_m$ ,  $K_s$ ,  $a + 2b = 1.2$  mM,  $Ca^{2+}$ ,  $V_{max} = \exp(1.5x + y)$ ,  $BOD = 2.7x^2$ .

### Isotopically Labeled Compounds

For simple molecules, isotopic labeling is indicated in the chemical formula (e.g.,  $^{14}CO_2$ ,  $^3H_2$ , 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.

$[^{14}C]$ urea	UDP- $[U-^{14}C]$ glucose
L- $[methyl-^{14}C]$ methionine	<i>E. coli</i> $[^{32}P]$ DNA
$[2,3-^3H]$ serine	fructose 1,6- $[1-^{32}P]$ bisphosphate
$[\alpha-^{14}C]$ lysine	
$[\gamma-^{32}P]$ ATP	

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).