

Copyright 2016, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2016, em Búzios/RJ no mês de maio de 2016.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Biossurfactantes produzidos por isolados da ilha oceânica da Trindade mostram ação antimicrobiana contra bactéria redutora de sulfato

Bruna A. Leão Ayupe^a, Péricles L. Fernandes^b, Pedro T. Valarelli^c, Paulo R. Cecon^d, Hilário C. Mantovani^e, Marcos R. Tótola^f

Abstract

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are considered the main group of microorganisms involved in biocorrosion processes in the oil industry. Strategies for control of its growth mainly involve the use of biocides. Microbial surfactants or biosurfactants are alternatives to currently used biocides because they have high biodegradability, low toxicity and are produced from renewable substrates. In this study, eight strains of *Bacillus* sp. were evaluated for the production of biosurfactants with antimicrobial activity against SRB *Desulfovibrio alaskensis*. The extracts containing the biosurfactants in concentration of 8 times the critical micelle concentration were evaluated by the diffusion method in solid medium. The extracts of biosurfactants obtained from *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II and *B. subtilis* TR47II, isolated of oceanic island Trinidad, showed antimicrobial activity against *D. alaskensis*. The greatest antimicrobial effect was obtained with the extract of *B. subtilis* TR47II, which had an average halo of inhibition of 21.6 mm. TR22, TR12 and TR 35II had average halos of inhibition 18.6 mm, 16.2 mm and 10.3 mm respectively.

Keywords: biosurfactant, *Bacillus subtilis*, antimicrobial action, sulfate-reducing bacteria, oil industry.

Resumo

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas o principal grupo de micro-organismos envolvidos em processos de biocorrosão na indústria de petróleo. Estratégias para o controle do seu crescimento envolvem principalmente o uso de agentes biocidas. Surfactantes microbianos ou biossurfactantes, por apresentarem alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção a partir de substratos renováveis, podem ser uma alternativa aos biocidas atualmente utilizados. Neste trabalho, oito isolados de *Bacillus* sp. foram avaliados quanto à produção de

^a Doutoranda Departamento de Microbiologia – Universidade Federal de Viçosa

^b Pós doutorando Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa

^c Graduando Ciências Biológicas - Universidade Federal de Viçosa

^d Professor Departamento de Estatística - Universidade Federal de Viçosa

^e Professor Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa

^f Professor Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa

biossurfactantes com ação antimicrobiana contra a BRS *Desulfovibrio alaskensis*. Os extratos contendo os biossurfactantes em concentração de 8 vezes a concentração micelar crítica foram avaliados pelo método de difusão em meio sólido. Os extratos de biossurfactantes obtidos de *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II, isolados da ilha oceânica da Trindade, mostraram ação antimicrobiana contra *D. alaskensis*. O maior efeito antimicrobiano foi obtido com o extrato de *B. subtilis* TR47II, o qual apresentou um halo médio de inibição de 21,6 mm. TR22, TR12 e TR 35II apresentaram halos médios de inibição de 18,6 mm, 16,2 mm e 10,3 mm respectivamente.

Palavras-chave: biossurfactante, *Bacillus subtilis*, ação antimicrobiana, bactéria redutora de sulfato, indústria de petróleo.

Introdução

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas, produzidas por uma variedade de micro-organismos e compreendem diferentes estruturas como lipopeptídeos, glicolipídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (1). Em razão de suas propriedades tensoativas, os biossurfactantes têm sido usados em diversas aplicações industriais e ambientais (2).

Bactérias do gênero *Bacillus* são reconhecidas por produzirem potentes biossurfactantes com ampla ação antimicrobiana (3), incluindo contra BRS (4), as quais são consideradas o principal grupo de micro-organismos envolvidos em processos de biocorrosão na indústria de petróleo (5). As BRS formam um grupo de bactérias anaeróbias que utilizam sulfato como aceptor final de elétrons na respiração, cuja atividade resulta na produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Esse processo biológico de produção de H₂S em reservatórios de petróleo é conhecido na indústria como *souring* biogênico (6). A produção de H₂S no reservatório diminui a qualidade do petróleo extraído, aumenta a corrosão dos equipamentos e tanques, pode resultar em entupimento dos reservatórios decorrente da precipitação de sulfeto de ferro e, como consequência, aumenta os custos de produção do petróleo (7). Além disso, o H₂S é tóxico e apresenta forte odor, o que diminui a qualidade do ar e põe em risco a saúde dos operadores (8).

Estratégias para controlar o crescimento de BRS na indústria de petróleo incluem principalmente o uso de biocidas, destacando-se o sulfato de tetrakis hidroximetil fosfônio (THPS). No entanto, o uso prolongado do mesmo biocida tem propiciado o surgimento de cepas resistentes, o que aumenta os custos e riscos ambientais associados à aplicação desse composto em alta dosagem (9). A necessidade de apresentar características tais como baixo custo, atendimento a normas ambientais, eficiência em amplo espectro e ser seguro para os operadores, limita o uso de biocidas para o controle de BRS na indústria de petróleo (9). Os biossurfactantes, por apresentarem baixa toxicidade (10), alta biodegradabilidade (11) e possibilidade de produção a partir de substratos renováveis (12), podem ser uma alternativa aos biocidas atualmente utilizados, se produzidos em larga escala. Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar a ação antimicrobiana de biossurfactantes produzidos por isolados de *Bacillus* sp. contra a BRS *Desulfovibrio alaskensis*.

Metodologia

Micro-organismos e condições de cultivo

As bactérias produtoras de biossurfactantes utilizadas neste estudo pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG (Tabela 1). As culturas de trabalho foram mantidas em meio ágar triptona de soja (TSA-Difco) a 4 °C.

Desulfovibrio alaskensis, isolada de reservatório de petróleo com histórico de *souring* (14), foi utilizada como micro-organismo teste nos ensaios de inibição. Essa BRS foi mantida a 30 °C em meio anaeróbio Postgate C (15) modificado.

Produção dos biossurfactantes

Os isolados foram reativados em TSA e transferidos para 3,0 mL de meio TSB (Difco), seguindo-se incubação a 30 °C em shaker orbital (New Brunswick Scientific), sob agitação constante de 200 rpm por 24 h. Duas transferências consecutivas (1 % v/v) foram realizadas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio mineral (MM) (g/L): K₂HPO₄ (13,9), KH₂PO₄ (2,7), NH₄Cl (1,0), extrato de levedura (0,05), NH₄NO₃ (1,0); pH 7,0. O meio foi suplementado após autoclavagem (121 °C, 20 minutos) com solução de glicose (20 g/L) e de micronutrientes (50 mL/L) (g/L): EDTA (0,5), MgSO₄.7H₂O (3,0), MnSO₄.H₂O (0,5), NaCl (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,1), CoCl₂.6H₂O (0,1), ZnSO₄.7H₂O (0,1), FeSO₄.7H₂O (0,1), CuSO₄.5H₂O (0,01), Na₂MoO₄.2H₂O (0,01), Na₂O₄Se (0,01), Na₂WO₄.2H₂O (0,01), NiCl₂.6H₂O (0,02). As culturas foram incubadas a 30 °C e 200 rpm por 24 h. O inóculo foi preparado por centrifugação da cultura a 10.000 g por 10 minutos e as células foram lavadas em solução de NaCl (8,5 g/L). Frascos Erlenmeyer de 1,0 L contendo 500 mL do MM foram inoculados com um volume de inóculo suficiente para se obter uma densidade óptica a 600 nm correspondente a 0,05. As fontes de carbono e nitrogênio do MM para produção dos biossurfactantes foram ajustadas para cada isolado, conforme resultados prévios (Tabela 2). As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm, por 5 dias.

Obtenção dos extratos brutos de biossurfactantes

Os biossurfactantes produzidos foram isolados segundo método descrito por Vater et al. (16) com modificações. Brevemente, as células foram removidas por centrifugação (10.000 g, 15 minutos, 4 °C), seguindo-se a precipitação dos biossurfactantes pelo ajuste do pH para 2,0, utilizando-se HCl 6 mol/L. Após incubação a 4 °C *overnight*, os biossurfactantes precipitados foram recuperados por centrifugação (10.000 g, 20 minutos, 4 °C) e dissolvidos em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0.

A diluição micelar crítica foi determinada pela medida da tensão superficial das diluições do extrato bruto de cada biossurfactante pelo método do anel de du Nouy (17), utilizando-se o tensiômetro Dataphysics modelo DCAT 11EC.

Avaliação da atividade antimicrobiana dos biossurfactantes

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos biossurfactantes foi avaliada pelo método de difusão em poço no meio sólido. Aliquota da cultura de *D. alaskensis* crescida por 24 h em meio anaeróbio Postgate C modificado (contendo aproximadamente 10⁵ UFC/mL) foi misturada, em câmara de anaerobiose (Anaerobic System Thermo Forma 1025), a 25 mL de meio sólido Postgate C fundido. A mistura foi vertida em placas de Petri (90 mm x 15 mm). Após solidificação, poços de 5 mm de diâmetro foram furados na superfície do meio e

20 µL da solução-estoque de cada biossurfactante (8 vezes a concentração micelar crítica-CMC) foram aplicados nos poços. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 30 °C por 6 dias. Os diâmetros das zonas claras ao redor dos poços foram medidos com auxílio de uma régua. O experimento foi desenvolvido no delineamento em blocos casualizados com 3 blocos e 4 repetições para cada extrato de biossurfactante. Os dados foram analisados por meio da análise de variância. As médias dos halos de inibição foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 1 % de probabilidade.

Resultados e discussão

Os extratos brutos de biossurfactantes obtidos dos isolados *B. subtilis* TR12, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR35II e *B. subtilis* TR47II apresentaram atividade antimicrobiana contra *D. alaskensis*, quando aplicados em concentração de 8 vezes a CMC. No entanto, não foi observado efeito antimicrobiano dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. TR14, *Bacillus* sp. TR14mut., *B. subtilis* TR27II e *B. subtilis* RI4967.

O extrato bruto do biossurfactante obtido de *B. subtilis* TR47II apresentou o maior efeito antimicrobiano contra *D. alaskensis*, com um halo médio de inibição de 21,6 mm (Fig. 1, Tabela 3). TR22 e TR12 apresentam halos médios de 18,6 mm e 16,2 mm, respectivamente, e TR35II mostrou-se o menos eficiente (10,3 mm) dentre os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana (Fig. 1). Pelo teste de Tukey, houve diferença entre os valores médios de diâmetro do halo de inibição entre esses biossurfactantes (Tabela 3).

Biossurfactantes são moléculas amplamente estudadas, dentre outras características, por suas propriedades antimicrobianas (18,19). Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. destacam-se como um dos mais potentes antibacterianos, sendo efetivos até mesmo contra patógenos multirresistentes (20, 21). Eles constituem diferentes lipopeptídeos, classificados principalmente na família das iturinas, fengicinas e surfactinas, os quais diferem no tipo e comprimento da cadeia de ácido graxo β-hidróxi e nos aminoácidos da porção peptídica (22). Vários lipopeptídeos podem ser produzidos por uma mesma bactéria. Como exemplo, Sun et al. (23) relataram a co-produção de fengicinas e surfactinas por *B. amyloliquefaciens* ES-2. *B. subtilis* THY-7 produz uma mistura de lipopeptídeos constituída por iturina, fengicina e surfactina (24).

Este estudo relata, pela primeira vez, o efeito antimicrobiano de biossurfactantes obtidos de *B. subtilis* isolados da ilha oceânica brasileira da Trindade. A diferença na eficiência de inibição relatada para os isolados TR12, TR22, TR35II e TR47II contra *D. alaskensis* provavelmente está relacionada a diferenças na composição química dos biossurfactantes produzidos por esses isolados. Estudos têm demonstrado que o comprimento e a composição dos ácidos graxos da cadeia carbônica dos lipopeptídeos, bem como a composição de aminoácidos na porção peptídica, podem resultar em ação antimicrobiana variável (25, 26). Além disso, a composição do meio de produção variou na fonte de carbono e nitrogênio fornecida para os isolados, o que pode ter influenciado na composição das moléculas produzidas (25).

Conclusões

Neste estudo, nós descrevemos a atividade antimicrobiana contra *Desulfovibrio alaskensis* de biossurfactantes produzidos por isolados da ilha oceânica da Trindade. O extrato bruto do biossurfactante obtido de *B. subtilis* TR47II foi o mais efetivo em inibir o crescimento de *D. alaskensis*. Análises da composição química desse biossurfactante podem

ajudar a esclarecer o mecanismo de ação contra *D. alaskensis*. Os resultados obtidos neste estudo estimulam pesquisas futuras para avaliar a eficiência do biossurfactante TR47II contra biofilmes e a biocorrosão causados por *D. alaskensis*, potencializando sua aplicação na indústria de petróleo.

Tabela 1 - Isolados produtores de biossurfactantes

Código	Identificação	Local de isolamento	Referência
TR12	<i>Bacillus subtilis</i>	Ilha da Trindade	Da Silva et al., 2015
TR14	<i>Bacillus</i> sp.	Ilha da Trindade	Da Silva et al., 2015
*TR14mut	<i>Bacillus</i> sp.	Ilha da Trindade	Este estudo
TR22	<i>Bacillus subtilis</i>	Ilha da Trindade	Da Silva et al., 2015
TR27II	<i>Bacillus subtilis</i>	Ilha da Trindade	Da Silva et al., 2015
TR35II	<i>Bacillus subtilis</i>	Ilha da Trindade	Da Silva et al., 2015
TR47II	<i>Bacillus subtilis</i>	Ilha da Trindade	Da Silva et al., 2015
RI4967	<i>Bacillus subtilis</i>	Água de produção Rio Itaúnas-ES	Este estudo

*TR14mut.: mutante do isolado TR14 obtido por irradiação com luz ultravioleta e que apresenta maior produção de biossurfactante comparada ao selvagem (dados não apresentados).

Tabela 2 - Fontes de carbono e nitrogênio do meio mineral (MM) para produção de biossurfactante pelos respectivos isolados

Código do isolado	Fonte de carbono (20 g/L)	Fonte de nitrogênio (0,35 g/L de N)
TR12	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR14	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR14mut	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR22	Sacarose	NH ₄ NO ₃
TR27II	Glicose	NH ₄ NO ₃
TR35II	Glicose	(NH ₄) ₂ SO ₄
TR47II	Sacarose	(NH ₄) ₂ SO ₄
RI4967	Glicose	NH ₄ NO ₃

Tabela 3 - Valores médios do diâmetro do halo de inibição para os respectivos extratos brutos dos biossurfactantes obtidos de *Bacillus subtilis* T47II, *B. subtilis* TR22, *B. subtilis* TR12 e *B. subtilis* TR35II contra *Desulfovibrio alaskensis*

Biossurfactante	Diâmetro do halo de inibição (mm)
TR47II	21,62 ±2,96 a
TR22	18,58 ±1,88 b
TR12	16,16 ±1,71 c
TR35II	10,29 ±1,37 d

Os halos de inibição (mm) representam a média ± desvio padrão de 3 repetições do experimento. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

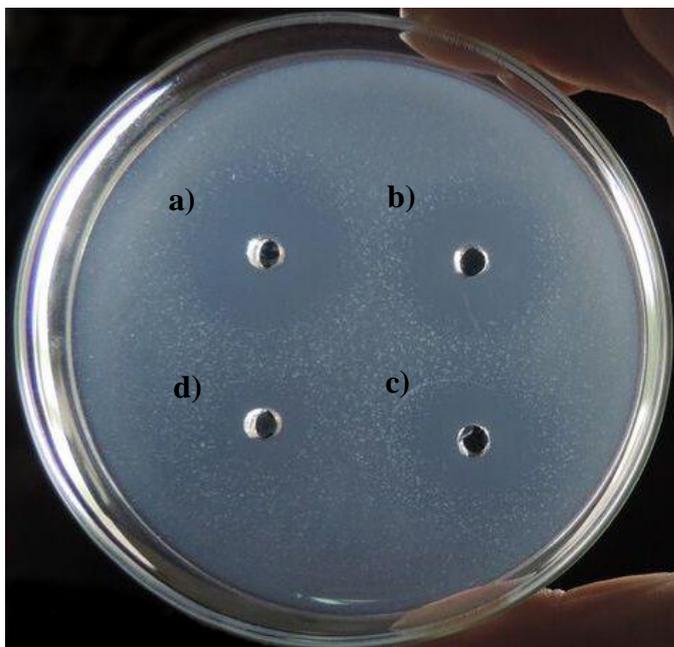


Figura 1 - Atividade antimicrobiana dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* TR47II (a), *B. subtilis* TR22 (b), *B. subtilis* TR12 (c) e *B. subtilis* TR35II (d) contra a bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* (10^5 UFC/mL) cultivada em meio Postgate C modificado. Alíquota de 20 μ L dos extratos brutos dos biossurfactantes (8 vezes a concentração micelar crítica) foi aplicada em poços de 5 mm de diâmetro e as placas foram incubadas a 30 °C por 6 dias em câmara de anaerobiose.

Referências bibliográficas

- (1) VAN HAMME, J.D., SINGH, A., WARD, O.P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.
- (2) MARCHANT, R., BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 558-565, 2012.
- (3) ENNING, D., GARRELF, J. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 1226-1236, 2014.
- (4) KORENBLUM, E., ARAUJO, L.V., GUIMARÃES, C.C.R., SOUZA, L.M., SASSAKI, G., ABREU, F., NITSCHKE, M., LINS, U., FREIRE, D.M.G., BARRETO-BERGTER, E., SELDIN, L. Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-13, 2012.
- (5) MNIF, I., GHRIBI, D. Review-Lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical environmental applications. **Journal of Peptide Science**, v. 104, p. 129-147, 2015.
- (6) HASEGAWA, R., TOYAMA, K., MIYANAGA, K., TANJI, Y. Identification of crude-oil components and microorganisms that cause souring under anaerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 1853-1861, 2014.
- (7) GIEG, L.M., JACK, T.R., FOGHT, J.M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 263-282, 2011.
- (8) REIFFENSTEIN, R.J., HULBERT, W.C., ROTH, S.H., 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 109-134, 1992.
- (9) XU, D., GU, T. The war against problematic biofilms in the oil and gas industry. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 7, p. 1-2, 2015.
- (10) LIMA, T.M.S., PROCÓPIO, L.C., BRANDÃO, F.D., LEÃO, B.A., TÓTOLA, M.R., BORGES, A.C. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957-2964, 2011a.
- (11) LIMA, T.M.S., PROCÓPIO, L.C., BRANDÃO, F.D., CARVALHO, A.M.X., TÓTOLA, M.R., BORGES, A.C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22, p. 585-592, 2011b.
- (12) FARIA, A.F., MARTINEZ, D.S.T., BARBOSA, G.N.O., VAZ, B.G., SILVA, I.S., GARCIA, J.S., TÓTOLA, M.R., EBERLIN, M.N., GROSSMAN, M., ALVES, O.L., DURRANT, L.R. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1951-1957, 2011.
- (13) DA SILVA, F.S.P., PYLRO, V.S., FERNANDES, P.L., BARCELOS, G.S., KALKS, K.H.M., SCHAEFER, C.E.G.R., TÓTOLA, M.R. Unexplored brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. **Extremophiles**, v. 19, p. 561-572, 2015.
- (14) FEIO, M.J., ZINKEVICH, V., BEECH, I.B., LLOBET-BROSSA, E., EATON, P., SCHMITT, J., GUEZENNEC, J. *Desulfovibrio alaskensis* sp. nov., a sulphate reducing

- bacterium from a soured oil reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1747–1752, 2004.
- (15) POSTGATE, J.R., 1984. The sulphate-reducing bacteria, second ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- (16) VATER, J., KABLITZ, B., WILDE, C., FRANKE, P., MEHTA, N., CAMEOTRA, S.S., Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6210–6219, 2002.
- (17) COOPER, D.G., ZAJIC, J.E., GERSON, D.F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 4–10, 1979.
- (18) GUDIÑA, E.J., ROCHA, V., TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 419–424, 2010.
- (19) INÈS, M., DHOUBA, G. Glycolipid biosurfactants: potential related biomedical and biotechnological applications. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 59–69, 2015.
- (20) SHALIGRAM, N.S., REKHA S. SINGHAL, R.S. Surfactin – a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 119–134, 2010.
- (21) SRIRAM, M.I., KALISHWARALAL, K., DEEPAK, V., GRACEROSEPAT, R., SRISAKTHI, K., GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, v. 85, p. 174–181, 2011.
- (22) WALIA, N.K., CAMEOTRA, S.S. Lipopeptides: biosynthesis and applications. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 7, p. 103–107, 2015.
- (23) SUN, G.L., LU, Z., BIE, X., LU, F., YANG, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1259–1266, 2006.
- (24) YANG, H., LI, X., LI, X., YU, H., SHEN, Z. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 2529–2542, 2015.
- (25) LIU, X., REN, B., GAO, H., LIU, M., DAI, H., SONG, F., YU, Z., WANG, S., HU, J., KOKARE, C.R., ZHANG, L. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. **PLoS One**, v. 7, p. 1–9, 2012.
- (26) PATHAK, K.V., KEHARIA, H., 2014. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. **3 Biotech**, v. 4, p. 283–295.