

## BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE SOLO CONTAMINADO POR AGROTÓXICOS

### RESUMO

A presença de agrotóxicos no solo além dos danos amplamente descritos na literatura científica, também induz a modificação da comunidade microbiana local. Devido à natureza dos compostos agrotóxicos há uma seleção induzida de bactérias produtoras de moléculas de biossurfactantes. Nosso estudo analisou o solo de uma região historicamente relacionada com agricultura e emprego de agrotóxicos por décadas. Foram empregadas técnicas indicadas para o isolamento e avaliação de bactérias produtoras de biossurfactantes. Os resultados mostraram uma relação elevada de bactérias produtoras de moléculas de biossurfactantes em relação à comunidade local cultivada. Dentre as 70 colônias isoladas inicialmente, 20 isolados apresentaram positivos para a produção destas moléculas. Após identificação filogenética foi constatado que a maioria das espécies é pertencente dos gêneros *Bacillus*, *Lysobacillus* e *Pseudomonas*.

**Descritores:** Solo; Agroquímicos; Bactérias.

## BIOPROSPECTION OF BIOSAFETY PRODUCING BACTERIA FROM SOIL CONTAMINATED BY AGROCHEMICALS

### SUMMARY

*The presence of pesticides in the soil besides the damages widely described in the scientific literature, also induces the modification of the local microbial community. Due to the nature of the pesticides there is an induced selection of bacteria producing molecules of biosurfactants. Our study analyzed the soil of a region historically related to agriculture and the use of agrochemicals for decades. Techniques indicated for the isolation and evaluation of bacteria producing biosurfactants were used. The results showed a high ratio of bacteria producing biosurfactant molecules to the cultivated local community. Among the 70 colonies initially isolated, 20 isolates showed positive for the production of these molecules. After phylogenetic identification it was verified that the majority of the species belong to the genus *Bacillus*, *Lysobacillus* and *Pseudomonas*.*

**Descriptors:** Tuberculosis; Substances, products and materials transportation; Epidemiology.

## BIOPROSPECCIÓN DE BACTERIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DEL SOLO CONTAMINADO POR AGROTÓXICOS

### RESUMEN

*La presencia de agrotóxicos en el suelo además de los daños ampliamente descritos en la literatura científica, también induce la modificación de la comunidad microbiana local. Debido a la naturaleza de los compuestos agrotóxicos hay una selección inducida de bacterias productoras de moléculas de biosurfactantes. Nuestro estudio analizó el suelo de una región históricamente relacionada con la agricultura y el empleo de agrotóxicos por décadas. Se emplearon técnicas indicadas para el aislamiento y evaluación de bacterias productoras de biosurfactantes. Los resultados mostraron una relación elevada de bacterias productoras de moléculas de biosurfactantes en relación a la comunidad local cultivada. Entre las 70 colonias aisladas inicialmente, 20 aislados presentaron positivos para la producción de estas moléculas. Después de la identificación filogenética se constató que la mayoría de las especies pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Lysobacillus* y *Pseudomonas*.*

**Descritores:** Tuberculosis; Transporte de sustancias, productos y materiales; Epidemiología.

Ana Carolina Kreischer<sup>1</sup>, Luciano Procopio Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estácio de Sá - Campus Petrópolis. Petrópolis/RJ/Brasil.

<sup>2</sup> Professor nos cursos de graduação na área da saúde e biológicas na Universidade Estácio de Sá. Coordenador do Laboratório de Biotecnologia Microbiana no Campus João Uchoa. Rio de Janeiro/RJ/Brasil.

## INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais atividades da civilização sobre a terra. Entre os diversos impactos ao meio ambiente e consequentemente a saúde humana o uso abusivo de agrotóxicos ainda é a maior preocupação sobre o solo. Os diferentes tipos de agrotóxicos, como pesticidas, herbicidas e inseticidas, são normalmente adsorvidos no solo e posteriormente atinge os corpos d'água, seja através da lixiviação por meio de chuvas ou alcançando aquíferos ou lençóis freáticos por meio de percolação<sup>(1)</sup>.

Os impactos ambientais sobre o solo, água e sua microbiota causados pelo uso dos agrotóxicos estão relacionados principalmente com o tempo de permanência de seus resíduos acima do tempo necessário para exercer sua ação. A persistência, por sua vez, é resultado da ausência de processos que modificam a estrutura química dos compostos e promovem sua dissipação, e é dependente de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem no próprio ambiente<sup>(2-4)</sup>.

Um grande número de espécies bacterianas de diferentes gêneros produz biossurfactantes. Esta propriedade é particularmente comum entre microrganismos que degradam compostos hidrofóbicos insolúveis em água, como o petróleo. Os bioemulsificantes são usados para melhorar a recuperação de óleo nos derrames no mar e remediação de solos por poluição com óleo<sup>(2-4)</sup>.

Os surfactantes são compostos químicos, de origem sintética ou não, formados de porções estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, o que em partes, lhes fornece propriedades incomuns incluindo: habilidade de diminuir a tensão superficial da água, aumentar a solubilidade, poder detergente, capacidade de formar emulsões e habilidades dispersantes. Surfactantes se concentram nas interfaces (sólido-liquido, liquido-liquido, ar-liquido), uma barreira interfacial existe entre duas fases imiscíveis, a porção hidrofóbica se direciona para a superfície, enquanto a porção hidrofílica se direciona para a solução<sup>(5)</sup>. Estes compostos são muito utilizados em diversos setores

industriais, pois atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos<sup>(6)</sup>.

Em geral, os surfactantes que atuam como emulsificantes são agentes que auxiliam na dispersão de um líquido em outro, como óleo em água. Esses compostos químicos atuam nas tensões superficiais e interfaciais e são capazes de formarem microemulsões, onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água e vice-versa, facilitando a degradação. Além da atividade emulsificante, o uso dos surfactantes é garantido por outras propriedades tais como: formação de micelas, formação de macro e microemulsões, adsorção, dispersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou antiespumante, solubilidade, solubilização, molhabilidade ou detergência<sup>(7)</sup>. Assim, os biossurfactantes emulsificam hidrocarbonetos, aumentando sua solubilidade em água, diminuindo a tensão interfacial e aumentando o deslocamento das substâncias oleosas agregadas às partículas do solo<sup>(8-9)</sup>.

São muitas as vantagens apresentadas pelos biossurfactantes quando comparado aos surfactantes de origem sintética, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodigestibilidade (que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos), possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais, uso em biorremediação de locais impactados por óleo, biodegradação e detoxificação de efluentes industriais, além de eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade, além de serem ambientalmente aceitos ao contrário dos surfactantes químicos<sup>(8)</sup>.

Os biossurfactantes podem ser obtidos por procedimentos relativamente simples como, por exemplo, processos fermentativos e podem apresentar estruturas químicas diversas. Estes aumentam a interação superficial água/óleo, e dessa forma, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos<sup>(9)</sup>.

O maior mercado para a utilização dos biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes<sup>(8)</sup>. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo (MEOR). Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais entre elas, à indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, devido sua atuação como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos com baixa solubilidade em água<sup>(6-7)</sup>.

Na agricultura estes biossurfactantes podem ser amplamente explorados, para a melhoria da biodegradação de poluentes removendo hidrocarbonetos e metais pesados além de degradar certos inseticidas químicos que se acumulam no solo agrícola, para melhorar a qualidade da agricultura do solo<sup>(10-11)</sup>.

O solo apresenta-se como um importante nicho para a

bioprospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes. A busca e a identificação deste microrganismo abrem novas possibilidades na aplicação deste composto. Diante das potencialidades dos biossurfactantes, como ação na biorremediação de ambientes contaminador por petróleo, no controle de crescimento de biofilme bacterianos, na aplicação de indústrias de alimentos, cosméticos e biocontrole, fazem-se necessária a busca e identificação de novas espécies bacterianas cultiváveis produtoras deste composto de surfactante<sup>(10-11)</sup>.

Neste estudo foram isoladas e identificadas estirpes bacterianas produtoras de biossurfactantes a partir de amostras de solos contaminados por agrotóxicos. Também foram avaliadas as principais características de emulsificação das moléculas de biossurfactantes produzidas pelas estirpes bactérias produtoras.

## METODOLOGIA

### Isolamento de bactérias a partir de solo contaminado

Uma amostra de solo contaminado com agrotóxico foi coletada em local com cultivo de hortaliças no bairro Caxambu, município de Petrópolis no estado do Rio Janeiro (RJ). O bairro Caxambu se destaca por ser um dos principais produtores de verduras e legumes, que abastece a região de Petrópolis e centros de abastecimento do Rio de Janeiro.

Foram realizada três coletas nos meses de abril, maio e junho de 2015, sendo todas no mesmo local, onde foram coletados aproximadamente 50 gr de solo a uma profundidade de cerca de 10cm abaixo da superfície. As amostras coletadas foram armazenadas, em caixa isotérmica com gelo e conduzidas ao laboratório sendo refrigerado até o processamento.

Para o isolamento de bactérias separou-se cerca de 1 gr da amostra de solo e transferiu-se a um tubo de poliestireno de 1,5 ml contendo 900 µl de água livre de nucleases estéril e levado ao agitador mecânico por 2 minutos. Após o período de agitação, o solo foi sedimentado e uma alíquota de 100 µL foi empregada para

semeadura em placa de Petri, com meio ágar nutriente, em seguida as placas foram mantidas em estufa de crescimento microbiológico a 22°C, por períodos de crescimento entre 24 e 72 horas.

Foram selecionadas 75 colônias crescidas de forma isolada. Estas colônias separadas e crescidas em 5 mL meio nutriente líquido, novamente incubadas, nas mesmas condições de crescimento descrito acima. Após crescimento, 0,5 mL, foram separadas e misturadas a 0,5 mL de glicerol 70%, identificadas e armazenadas a -20°C.

#### **Seleção de colônias bacterianas produtoras de biossurfactantes Índice de emulsificação E24**

A seleção das colônias bacterianas produtoras de biossurfactantes, foi feita através do índice de emulsificação 24 horas (E24)<sup>(12)</sup>. Cada colônia esteve cultivada em tubos de ensaio de 15 ml, contendo 3 ml de meio nutriente líquido, durante 72 horas em estufa a 22°C, sob agitação de cerca de 100 rpm em condições de aerobiose. Após crescimento as culturas sofreram centrifugação por 6 minutos a 6000 rpm, 2 mL do

sobrenadante recuperado em cada colônia, foi transferido para novo tubo de ensaio de 15 ml e adicionou-se 2 ml de óleo de milho comercial.

Em seguida, agitaram-se as misturas por 2 minutos deixando-as em repouso por 24 horas. O líquido em cada tubo de ensaio atingiu 3 cm e o índice de emulsificação (E24) calculado como porcentagem através da fórmula:  $E24 = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$ .

#### **Teste de colapso da gota**

A partir das colônias bacterianas, que apresentaram resultado satisfatório no teste de emulsificação, realizou-se o teste com método de colapso da gota, empregando óleo de milho. As colônias foram inoculadas em tubos de ensaio de 15 ml, contendo 3 ml de meio nutriente líquido e acondicionadas em estufa a 22°C por 7 dias.

Para a realização do teste, utilizou-se Becker de 50 ml para cada linhagem. Em cada Becker foi adicionado 35 ml de água e 100 µl de óleo de milho, o qual formou uma gota visível do óleo na superfície da água, em seguida adicionou-se 10

µl da cultura bacteriana na superfície do óleo. Após aproximadamente dois minutos, observou-se visualmente a forma da gota na superfície do óleo, o resultado foi considerando positivo quando ocorreu o espalhamento da gota total ou parcialmente, negativo quando a gota permaneceu inalterada. O controle negativo foi realizado adicionando 10 µl de meio nutriente líquido estéril sem prévio crescimento.

#### **Teste de atividade hemolítica**

As linhagens selecionadas como positivas no teste de colapso da gota foram submetidas ao teste de atividade hemolítica, as mesmas estavam sendo conservadas em meio nutriente Ágar e foram inoculadas em meio nutriente líquido por 7 dias a 22°C, após este período foram semeadas em placa de Petri no meio ágar sangue e acondicionadas também a 22°C. Após período de 48 horas verificou-se a formação de um halo claro ao redor da colônia indicando a ação hemolítica de moléculas de biossurfactantes.

#### **Análise filogenética da comunidade microbiana**

A partir de 2  $\mu\text{L}$  de cultura crescida de cada isolado, realizou-se a amplificação do gene rRNA 16S, utilizando-se da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Os iniciadores empregados foram o PA (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e PH (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3').

A reação de PCR foi preparada com reagentes da empresa Promega, nas concentrações de 2,5 mM/ $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$  de dNTPmix, 1  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$  de cada iniciador, 0,2 U/ $\mu\text{L}$  da enzima TaqPolimerase, mais cerca de 100 ng de DNA ambiental. As condições da reação foram uma etapa de 95°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por 2 minutos, e uma etapa final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, para a análise por padrão de massa e tamanho. Posteriormente, os produtos da reação de PCR foram purificados, empregando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* da Promega, seguindo o protocolo do fabricante.

Cerca de 35 ng de DNA de cada amostra foram enviados para sequenciamento, no laboratório de sequenciamento do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os resultados do sequenciamento foram utilizados em análise computacional, a fim de inferir as aproximações filogenéticas das referidas sequencias, empregando o programa MEGA5 e BLASTN.

A análise *bootstrap* foi empregada para avaliar a topologia da árvore filogenética por cerca de 1000 vezes de reassociações.

## RESULTADOS

### Testes de emulsificação

Este método é aplicado a fim de determinar a capacidade que as colônias apresentam de emulsificar óleo em água, sugerindo assim se estes são capazes de produzir biossurfactantes. A determinação do índice de emulsificação foi realizada com o sobrenadante livre de células de 75 colônias bacterianas e os resultados observados após 24 horas.

Dos 75 isolados analisados, apenas uma colônia (SC59) não

ocorreu nenhum índice de emulsificação, enquanto 19 colônias apresentou índice abaixo de 40%, 34 colônias apresentaram índice entre 40 e 50%, 19 colônias entre 50,1% e 60%, a colônia SC68 apresentou índice de 64% e SC71 índice de 100%.

### **Teste de colapso da gota**

Esta técnica possibilita visualizar o efeito direto do biossurfactante sobre o óleo, além de indicar o resultado imediato. Embora o resultado seja qualitativo foi estabelecido parâmetros para melhor avaliar a ação do biossurfactante sobre a gota de óleo.

O teste de colapso da gota foi realizado com 32 colônias, que obtiveram índice de emulsificação acima de 50%. Sobrenadantes de 8 colônias não apresentou nenhuma alteração sobre a gota de óleo, enquanto sobrenadantes de 15 colônias provocaram o colapso da gota e em 9 colônias, além do colapso, também induziu o espalhamento da gota de óleo.

### **Teste de atividade hemolítica**

O teste de atividade hemolítica foi realizado nas 24 colônias bacterianas que

óleo, sendo (-) os biossurfactantes que não colapsaram a gota de óleo, (+) biossurfactantes que colapsaram a gota e (++) biossurfactantes que colapsaram e dispersaram a gota de óleo.

O teste de colapso da gota foi realizado com 32 colônias, que obtiveram índice de emulsificação acima de 50%. Sobrenadantes de 8 colônias não apresentou nenhuma alteração sobre a gota de óleo, enquanto sobrenadantes de 15 colônias provocaram o colapso da gota e em 9 colônias, além do colapso, também induziu o espalhamento da gota de óleo. apresentam resultado positivo no teste de colapso da gota.

No presente trabalho, os testes foram realizados em placas de Petri contendo sangue de ágar sangue de carneiro, para verificar a presença de hemólise e os resultados analisados entre 48 horas e 96 horas.

Nossos resultados mostram que das 24 colônias testadas, apenas 4 não apresentou hemólise, enquanto as 20 outras colônias, mostrou um halo claro em volta da colônia.



### Análise filogenética das colônias produtoras de biossurfactante

Após análise de todos os resultados, 14 colônias foram separadas e identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S ribossomal, vide metodologia.

Na tabela 1, são apresentados os melhores índices de similaridades entre as sequências de DNA das 14 colônias, com as sequências depositadas no banco NR, disponível no sítio NCBI.

Entre as 32 colônias identificadas, 14 apresentam homologia com espécies do gênero *Bacillus*, três mostram homologia com espécies do gênero *Pseudomonas* e duas com o gênero *Lysinibacillus*. A espécie de maior

prevalência foi *Bacillus toyonensis strain* BCT-7112, identificada em 7 sequencias analisadas.

Na tabela 1, são apresentados os melhores índices de similaridades entre as sequências de DNA das 14 colônias, com as sequências depositadas no banco NR, disponível no sítio NCBI.

Entre as 32 colônias identificadas, 14 apresentam homologia com espécies do gênero *Bacillus*, três mostram homologia com espécies do gênero *Pseudomonas* e duas com o gênero *Lysinibacillus*. A espécie de maior prevalência foi *Bacillus toyonensis strain* BCT-7112, identificada em 7 sequencias analisadas.

**Tabela 1** - Alinhamento entre os genes 16S ribossomal das colônias selecionadas, contra o banco de genes 16S disponível no sítio NCBI.

Colônia	Microrganismo	E -value	Identidade
4	<i>Bacillus nematocida</i> strain B-16	0.0	98%
6	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.0	99%
8	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.0	98%
14	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	8e-179	98%
16	<i>Pseudomonas monteillii</i>	0.0	99%
18	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> strain NBRC 103144	0.0	99%
19	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	0.0	99%
21	<i>Bacillus subtilis</i> strain 168	0.0	99%
23	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.0	99%

26	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.0	99%
28	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain DSM 28	0.0	99%
29	<i>Pseudomonas monteilli</i>	0.0	98%
33	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.0	99%
37	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	0.0	99%

Fonte: Dados da pesquisa. 2015.

## DISCUSSÃO

Para um biossurfactante ser considerado como bom emulsificante o critério a ser analisado é a capacidade de formar emulsão e manter emulsionada acima de 50% por 24h ou mais<sup>(13)</sup>.

Nesta pesquisa, foi considerado como resultado positivo as colônias que apresentam índice de emulsificação superior a 46,66%, totalizando 32 colônias, que correspondem a 44,4% das colônias testadas.

Estudos utilizando óleo diesel como agente apolar obteve índice de emulsificação entre 50 e 53%<sup>(14-15)</sup>. Enquanto avaliação de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* J4, utilizando diferentes substratos como fontes de carbono, obtiveram maior índice de emulsificação entre 70% e 80% para o querosene<sup>(16)</sup>.

A linhagem *P. aeruginosa* apresenta alto potencial de produção de biossurfactantes, assim

como diferentes espécies do gênero *Bacillus*. Avaliações do potencial de emulsificação de estirpes da espécie *P. aeruginosa* apresentaram resultados que variaram entre 12% a 90%, dependendo da fonte de carbono utilizada, mostrando que a produção de biossurfactantes está diretamente relacionada com a fonte de carbono escolhida<sup>(17-18)</sup>.

Índices de até 100% foram obtidos com diferentes testes de emulsificação na presença de petróleo, óleo de motor queimado, óleo pós-fritura entre outros óleos de elevado peso molecular, quando produzido por *Bacillus licheniformis* empregando lisado de abacaxi<sup>(19)</sup>.

O teste de colapso da gota e a atividade hemolítica são amplamente empregados na prospecção por microrganismos produtores de biossurfactantes<sup>(20)</sup>.

Estes métodos foram utilizados para avaliar 205 estirpes bacterianas, em diferentes ambientes naturais, mostrando que

os resultados positivos de colapso da gota e hemólise, quando comparados com avaliação da ação da diminuição da tensão superficial, apresentam um elevado índice de falso positivo<sup>(20)</sup>.

Os mesmo resultados foram similares no estudo de avaliação da técnica de colapso da gota em bactérias e fungos<sup>(20)</sup>. Desta forma, estas avaliações qualitativas devem ser sempre comparadas com outros resultados, como E24 horas e avaliação da ação da diminuição da tensão superficial.

Nossos resultados aqui apresentados levam em consideração sempre os resultados E24, o qual apresenta índice quantitativo e se apresentam mais confiantes.

## CONCLUSÃO

Nosso estudo possibilitou o isolamento de 72 colônias bacterianas a partir das amostras de solo coletadas em três etapas em local com cultivo de hortaliças e com uso de agrotóxicos por anos. O solo analisado apresentou resultados condizentes com o descrito na literatura científica, apresentando-se propício a

prospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes.

Nas 72 colônias bacterianas selecionadas para a realização dos testes de produção de biossurfactantes, identificamos um número de 20 possíveis produtoras de biossurfactante, apresentando resultado positivo pontos principais três métodos de prospecção.

Nossos resultados demonstram que várias colônias se apresentam como boas produtoras de biossurfactantes, potenciais para aplicações nas áreas biotecnológicas onde requer ações emulsificantes.

## REFERÊNCIAS

- 1- Frenkel J, Silveira JM. Tarifas, preços e a estrutura industrial dos insumos agrícolas: o caso dos defensivos. Textos para Discussão do IPEA. 1996; 412:133.
- 2- Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 1999; 74(1):65-76.
- 3- Brookes PC. The use of microbial parameters in monitoring soil. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy-metals. Biol. Fert. Soils. 1995;19(2):269-79.
- 4- Pereira JC, Neves MCP, Drozdowicz A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. Pesquisa Agropecuária. 1999;34(5):801-11.
- 5- Mulligan CN. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution. 2005; 133:183-98.
- 6- Gouveia ER, Lima DPA, Duarte MS, Lima GMS, Araújo JM. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2003;30:39-45.

- 7- Nitschke M, Pastoreg M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*. 2002;25:772.
- 8- Banat IM. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*. Essex. 1995;51:1-12.
- 9- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;53(5):495-508.
- 10- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 87(2):427-44.
- 11- Takenaka S, Tonoki T, Taira K, Murakami S, Aok K. Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7-6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways. *Applied Environmental Microbiology*. 2007;73:1797-802.
- 12- Iqbal S, Khalid ZM, Malik KA. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*. 1995; 21:176-79.
- 13- Willumsen PA, Karlson U. Screening of bacteria isolated from PAH- contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1997;7:415-23.
- 14- Luz CC, Santos EA, Santos MOS, Mussu MY, Yamashita M, Bastos WR, Bruncha G, Reis MM, Reis MG. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho - RO, Amazônia. *Química Nova*. 2011, XY:1-5.
- 15- Batista SB, Mounteer AH, Amarin FR, Tólola MR. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*. 2006; 97:868-75.
- 16- Wei YH, Chou CL, Chang JS. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. 2005; 27:146-54.
- 17- Haba E, Espuny MJ, Busquets M, Manresa A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88:379-87.
- 18- Costa SGVAO, Nitschke M, Contiero J. Produção de biotensioativo a partir de resíduos de óleos e gorduras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008; 28(1):34-8.
- 19- Almeida FC, Acioly LM, Campos-Takaki GM. Produção de bioemulsificantes por *Bacillus licheniformis* UCP1016 usando abacaxi (*Ananas comosus* L.) como meio alternativo. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada; 2009; Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo; Rio Claro; 2009.
- 20- Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods*. 1998;32:273-80.