

## PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *Chromobacterium violaceum* UTILIZANDO COMO SUBSTRATO ÓLEO VEGETAL (ÓLEO DE PEQUI)

Mayhara Martins Cordeiro BARBOSA <sup>(1)</sup>; Mabel Calina de França PAZ <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Aluna do Curso de Tecnologia em Gestão Ambiental CEFET/CE, End. Rua Senador Pompeu, 2508 CEP: 60025-900 E-mail: [mayhara\\_martins@yahoo.com.br](mailto:mayhara_martins@yahoo.com.br)

<sup>(2)</sup> Bióloga; Dra. em Microbiologia Aplicada. E-mail: [mabel@cefetce.br](mailto:mabel@cefetce.br)

### RESUMO

A *Chromobacterium violaceum* pertence ao grupo das bactérias Gram-negativas, facultativa anaeróbica e sua temperatura de crescimento pode variar de 15-40°C, sendo 30°C a temperatura ideal para seu cultivo, favorável em regiões tropicais. Esta bactéria destaca-se por apresentar grande potencial para aplicações biotecnológicas diversas. Assim surgiu o interesse em avaliar a sua capacidade em produzir biossurfactantes, compostos formados por moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que através de seu acúmulo nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade reduzem a superficial, permitindo o aumento da biodisponibilidade e biodegradação. Neste trabalho, foi verificada a produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como fonte de carbono óleo de pequi. Os ensaios foram realizados em duplicata a 30°C, 150rpm, durante 60 horas e as amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas, sendo centrifugada por 15 minutos a 3500xg para a separação do líquido metabólico. A produção de biossurfactantes foi medida através do Índice de Emulsificação e Atividade de Emulsificação, também foram acompanhados os resultados de proteínas totais e pH. A média foi de 40% para o Índice de Emulsificação e o melhor resultado de Atividade de Emulsificação foi 1,108 U.A.E. Os resultados demonstraram que a cepa bacteriana mostrou-se capaz de se desenvolver e produzir biossurfactantes utilizando óleo de pequi como fonte de carbono, uma vez que os índices de emulsificação obtidos se mostraram satisfatórios.

**Palavras-chave:** *Chromobacterium violaceum*, biossurfactantes e óleo de pequi.

## 1. INTRODUÇÃO

Pesquisas que buscam alternativas de tratamento aos impactos causados pelo ser humano estão sendo realizadas com objetivo de reduzir os problemas ambientais gerados. Na busca de novas tecnologias, estudos vêm demonstrando que os processos biológicos podem ser as melhores escolhas. Nesse contexto surgem à produção de surfactantes de origem biológica, moléculas tensoativas capazes de diminuir a tensão superficial entre líquidos. Os biosurfactantes são produzidos por microrganismos que se mostram capazes de produzir uma grande variedade de compostos tensoativos.

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia facultativa que vive em regiões tropicais, geralmente em solos e rios. No Brasil é encontrada principalmente às margens do Rio Negro, na Amazônia. Escolhida para o sequenciamento do seu genoma no Projeto Genoma Nacional Brasileiro (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003), esta bactéria destaca-se por apresentar um grande potencial para aplicações biotecnológicas diversas. Uma das características mais marcantes da *C. violaceum* é a produção, dentre outros metabólitos, de um pigmento de cor violeta, chamado violaceína, quando cultivada em presença de oxigênio. Embora o papel fisiológico da violaceína para a bactéria seja desconhecido, extratos brutos do pigmento têm demonstrado atividades antibióticas e tripanocida (CALDAS *et al.*, 1978; DURÁN *et al.*, 1998). Apesar de seu potencial biotecnológico poucos estudos vêm sendo realizados para verificar sua capacidade em produzir tensoativos.

Biosurfactantes são compostos anfipáticos capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos, considerados macromoléculas, total ou parcialmente extracelulares (BICCA *et al.*, 1999), em geral são produzidos por microrganismos capazes de crescerem em substratos insolúveis em água (INOH *et al.*, 2003). Sua maior produção depende do substrato utilizado para produção, da cinética do crescimento microbiano e da linhagem (KARANTH *et al.*, 1999). Os biosurfactantes possuem características importantes frente aos surfactantes sintéticos, tais como a alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, resistência a altas concentrações salinas e estabilidade quanto a variações de pH (KIM *et al.*, 2000). Estas características permitem a sua utilização em diversos setores industriais (BANAT *et al.*, 2000).

A utilização de biosurfactante tem sido cada vez mais aceita no mercado devido a sua vasta aplicação, podendo ser utilizado em diversas áreas, como é o caso das indústrias de alimentos, farmacêutica, cerâmica, papel, metal, tratamento de efluentes, dentre outras (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004). As aplicações mais promissoras são as de limpeza de óleo em tanques de navios e biorremediação em derramamento de óleos e petróleo (SULLIVAN, 1998).

De acordo com Gruber *et al.* (1993), o pré-requisito para a produção de biosurfactantes é a obtenção de produtos com grande atividade, produzidos a partir de substratos baratos através de processos economicamente viáveis e com alto rendimento.

O óleo de pequi é originário de fonte oleaginosa considerada regional, se apresentando como fonte alternativa de carbono, como também substrato para fermentações microbianas de baixo custo. O óleo foi adquirido em mercado popular, onde foi extraído de forma artesanal, evidenciado pela forma como são comercializados.

Visando alternativas de fontes de carbono de baixo custo para produção de biomoléculas e posteriormente ser utilizado em tratamentos biológicos o propósito deste trabalho é de verificar a capacidade de *C. violaceum* em produzir biosurfactantes, utilizando como substrato óleo vegetal.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A *Chromobacterium violaceum* é considerada como microbiota comum de solos e águas tropicais e subtropicais onde podem ter um papel importante na rizosfera. Locomove-se por meio de um flagelo polar e de vários flagelos laterais e sua temperatura de crescimento pode variar de 15-40°C, sendo 30°C a temperatura ideal para seu cultivo (PEREIRA *et al.*, 2004). É capaz de realizar a biossíntese de polissacarídeos complexos como celulose (mas não glicogênio) e também síntese e degradação de uma variedade de lipídeos, que são utilizados para a formação de membrana e

armazenamento energético, incluindo triacilglicerol, fosfolípido e lipopolissacarídeo (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003). Há também interesse industrial pela *C. violaceum* por produzir poliésteres que podem ser usados para fazer polihidroxialcanoatos (PHAs), os quais são alternativa para os plásticos feitos por petroquímicos (FORSYTH *et al.*, 1958); e tem também despertado interesse por produzir cianeto, o qual exerce função para a solubilização do ouro, processo livre de 54 mercúrio, evitando a conseqüente contaminação do ambiente por este metal pesado (CAMPBELL *et al.*, 2001).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de produzir agentes de superfície ativa (bioemulsificantes e biossurfactantes) em meio de cultura contendo substratos hidrossolúveis (glicose, sacarose, etanol e glicerol) ou hidrofóbicos (hidrocarbonetos) como fonte de carbono (ROSEMBERG e RON, 1999). A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura durante o estado estacionário ou então, na fase de crescimento exponencial (RON e ROSEMBERG, 2001). Quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). Porém, alguns microrganismos mantêm os biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a penetração das moléculas hidrofóbicas no espaço periplasmático (KOCH *et al.*, 1991). A mudança de substratos altera a estrutura do biossurfactante e, conseqüentemente as propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (COOPER, 1986). Diversos são os estudos realizados por vários autores na produção de biossurfactantes, envolvendo propriedades físico-químicas e nutricionais (BATISTA *et al.*, 2006)

Os surfactantes biológicos apresentam as mesmas características dos químicos, reduzem as tensões interfacial e superficial, tanto em soluções aquosas quanto em misturas de hidrocarbonetos. Possuem uma estrutura comum, onde a porção hidrofílica pode ser composta de aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, enquanto a porção hidrofóbica é constituída de uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, saturados ou insaturados. O biossurfactante é classificado de acordo com a composição química da molécula e com o microrganismo que o originou. Encontram-se, descritas na literatura, cinco classes de biossurfactantes: glicolípídeos, lipoproteínas e lipopeptídeos, lipídeos neutros, ácidos graxos e fosfolípídeos, polímeros e os particulares (BANAT, 2000). Vale ressaltar que os ramnolípídeos, surfactantes pertencentes à classe dos glicolípídeos produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, são os mais estudados (TULEVA *et al.*, 2002).

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa, produzidos a partir de microrganismos, é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades fornecem potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, construção, bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêutica, cosmética (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

O processo de fermentação possui a chave para reduzir os custos do processo fermentativo (GALLERT e WINTER, 2002). Atualmente, muitos estudos têm sido realizados na seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes para as indústrias alimentícias e petroquímicas, em especial, na recuperação de óleos, de hidrocarbonetos derivados do petróleo, com vantagens em relação aos surfactantes sintéticos sobre o uso em biorremediação, na extração, na emulsificação de óleos e no transporte do óleo bruto (KIM *et al.*, 2000). Como também, estudos estão sendo direcionados para o desenvolvimento de tecnologias buscando melhorar as linhagens e processos de produção, devido à vasta aplicabilidade dos biossurfactantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Geralmente, os biossurfactantes são produzidos durante o crescimento em hidrocarbonetos, os quais são caros, aumentando o custo total do processo. Por outro lado, substratos solúveis e menos dispendiosos podem ser utilizados em algumas ocasiões. Na procura de substratos de baixo custo, os óleos vegetais e os efluentes industriais surgem como promissores (RON e ROSEMBERG, 2001). O uso de resíduos agrícolas, resíduos das indústrias de processamento de batatas e resíduos gordurosos de frangos tem sido mencionado (GALLERT e WINTER, 2002; TULEVA *et al.*, 2002).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Microrganismo

Para realização dos experimentos foi utilizada a cepa de *Chromobacterium violaceum* isolada de uma lagoa de Fortaleza (lagoa Maria Vieira) e encontra-se no banco de cultura do Laboratório Integrado de Águas de Mananciais e Residuárias (LIAMAR) no Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará (CEFET/CE). A cultura foi mantida a temperatura ambiente em ágar nutriente inclinado, sendo repicada mensalmente para manter a viabilidade celular.

#### 3.2. Crescimento celular

##### 3.2.1. Meio de Cultura

Meio composto por: 0,6% cloreto de sódio (NaCl), 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona e 1% da fonte de carbono. Os constituintes foram dissolvidos e o meio esterilizado em autoclave a 121°C a 1,0 atm por 15 minutos. O óleo de pequi foi esterilizado por fluxo contínuo, separadamente, e adicionado ao meio de cultivo após esterilização do mesmo.

##### 3.2.2. Condições de cultivo

Para fazer o pré-inóculo foi transferida para erlenmeyer com capacidade de 250ml contendo 150ml de meio complexo com 1% (v/v) de óleo de pequi, cultura jovem de *Chromobacterium violaceum*, onde foi mantida a 30°C sob agitação orbital a 150rpm por 24hs. Após 24 horas de cultivo foi transferido 1,5 ml ( $10^7$  UFC/mL) do pré - inóculo para 10 frascos de erlenmeyers com capacidade de 250ml contendo 150ml de meio com 1% (v/v) de óleo de pequi. Após o período de incubação, cada cultura foi submetida à leitura da densidade ótica a 660nm e centrifugação de 3000g por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação do líquido metabólico que foi utilizado para estimação da produção de biossurfactante (índice e atividade de emulsificação), pH e teor de proteínas totais.

#### 3.3. Produção de biossurfactantes

##### 3.3.1. Índice de Emulsificação (análise quantitativa)

O líquido metabólico livre de células foi utilizado para determinar o índice de emulsificação pelo método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Para determinação do índice foram utilizados 2 ml do líquido metabólico e 1 ml de n-hexadecano, homogeneizado em vórtex por 2 minutos, a 25° C. A leitura foi realizada através de medição da altura da emulsão formada após dois minutos de repouso ( $T_0$ ). O índice foi calculado através da equação: Índice da Emulsão (%) =  $He \times 100 / Ht$ , onde He = altura da emulsão; Ht = altura total do líquido. As leituras foram repetidas com 24 horas ( $T_{24}$ ) e uma semana ( $T_7$ ) de repouso para verificar a estabilidade da emulsão.

##### 3.3.2 Atividade de Emulsificação (análise qualitativa)

A determinação da atividade de emulsificação foi segundo Cirigliano e Carman (1984). Foram utilizados 2ml do líquido metabólico (livre de células), 2 ml de tampão acetato de sódio (0.1M) e 1 ml de n-hexadecano. A solução foi agitada por 2 minutos e aguardou-se 10 minutos. Após este período, a emulsão formada foi retirada para leitura em espectrofotômetro (SP - 220 - BIOESPECTRO) a 540nm. O resultado foi calculado por  $ABS \times 2$ , onde é representado por U.A.E. (Unidade de Atividade de Emulsificação). O teste foi realizado em duplicata para cada hora de cultivo.

#### 3.4. Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico do Biureto (LABTEST® - Diagnostic - Brasil).

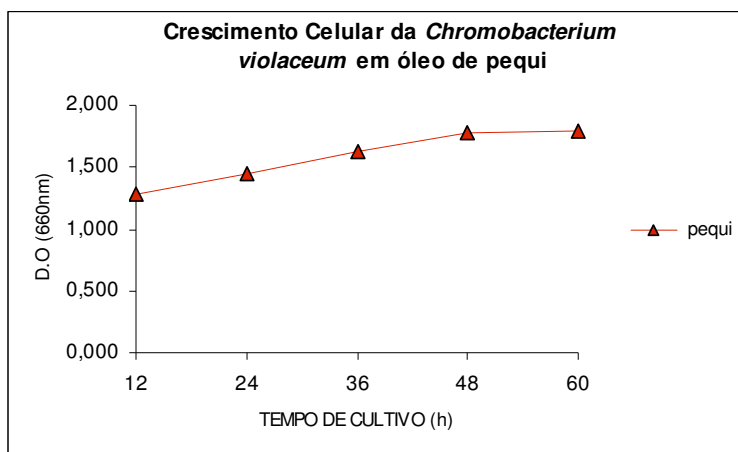
### 3.5. Determinação do pH

O pH do líquido metabólico livre de células foi determinado utilizando medidor de pH (PROLAB®).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento Celular

A seguir estão apresentados os dados cinéticos de crescimento celular de *C. violaceum* em meio líquido contendo 1% de óleo de pequi, durante as 60 horas de cultivo. Em geral a densidade ótica tem como finalidade observar a curva de crescimento do microrganismo no substrato empregado. A utilização do óleo como substrato para *C. violaceum* é mostrada pelo aumento do crescimento celular durante os experimentos.



**Figura 1: Crescimento Celular da *C. violaceum* em Óleo de Pequi**

A FIGURA 1 mostra a maior Densidade Ótica ( $D.O_{660}$ ) de *C. violaceum* em 60 h de cultivo com valores de, aproximadamente, 1,79, porém a velocidade do crescimento celular tende a se estabelecer em 48hs, caracterizando a fase *lag* do experimento.

### 4.2. Produção de Biossurfactantes em Óleo de Pequi

A produção de biossurfactante utilizando como substrato os óleos vegetais ocorre através da utilização dos ácidos graxos obtidos dos triglicerídeos do óleo, enquanto o glicerol liberado deve ser utilizado para a manutenção da energia. Levisauskas *et al.* (2004) relatam que a concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para a taxa de crescimento celular são os mais importantes fatores que influenciam a biossíntese de biossurfactante. A função biológica do biossurfactante é proporcionar a assimilação do óleo vegetal disperso no meio, pois segundo Bognolo *et al.* (1999), os biossurfactantes apresentam como característica a detergência, que permite quebrar as moléculas dos óleos, tornando-os assimiláveis pelo microrganismo e assim influenciando na produção de biomassa e consequentemente numa expressiva produção de biomoléculas, havendo a liberação extracelular do mesmo. Na tabela 1 estão apresentados os resultados encontrados no ensaio com *C. violaceum* utilizando óleo de pequi, como fonte de carbono, acrescido ao meio de cultivo para a produção de biossurfactante.

Tabela 1 - Resultados das análises da produção de biossurfactantes por *C. violaceum* utilizando como substrato óleo de pequi.

Tempo de cultivo (h)	Índice de Emulsificação – I.E (%)			Atividade de Emulsificação (U.A.E.)	Proteínas Totais (g/dL)	pH
	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>S</sub>			
12	41,72	2,58	1,66	0,590	3,51	8
24	40,08	8,33	7,66	1,108	3,64	7
36	40,00	9,16	3,33	0,750	3,74	7
48	42,50	26,66	7,50	0,485	3,54	8
60	43,33	11,66	7,50	0,630	2,79	8

Legenda: T<sub>0</sub> (Índice de Emulsificação após dois minutos de repouso); T<sub>24</sub> (Índice de Emulsificação após 24 horas de repouso) T<sub>S</sub> (Índice de Emulsificação após uma semana de repouso); U.A. E: unidade de atividade de emulsificação.

O melhor resultado da análise quantitativa, índice de emulsificação, foi encontrado com 60 horas de cultivo (43,3%). Porém, a maior estabilidade da emulsão formada foi verificada com 24 horas, quando aproximadamente 17% permaneceu após uma semana de repouso, horário em que também foi encontrado melhor resultado de atividade de emulsificação com 1,11 U.A.E., demonstrando que a estabilidade da emulsão está diretamente relacionada à qualidade da mesma.

Assim pelos valores encontrados pode-se observar que a síntese deste biopolímero pela *C. violaceum*, quando se verificou produção, foi realizada de forma semelhante durante todo o seu crescimento em óleo de pequi. A correlação entre produção de biossurfactantes e crescimento celular em substratos insolúveis em água foi mostrada por Itoh e Suzuki (1972), onde se comprovou que a produção de ramnolípídeos estimulou o crescimento da linhagem mutante de *P. aeruginosa* PU-1.

A concentração máxima de proteínas totais foi de 3,74 g/dL em 36 horas, porém os valores encontrados foram similares ao longo das 60 horas de crescimento, indicando que o microrganismo excretou boa quantidade de metabólitos para adapta-se as condições oferecidas para seu crescimento. As proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, transportadores através das membranas celulares dentre outros (DARNELL *et al.*, 1990). Enzimas são, portanto, na sua grande maioria proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas. O pH do líquido metabólico livre de células apresentou-se levemente alcalino.

## 5. CONCLUSÃO

Os estudos realizados com a cepa de *Chromobacterium violaceum* apresentam as seguintes conclusões:

- Observou-se que a utilização do óleo de pequi como substrato de baixo custo para a produção de biopolímeros por *Chromobacterium violaceum* é viável, sendo uma boa alternativa para diminuir os custos na produção de biossurfactantes, potencializando o número de aplicações biotecnológicas deste microorganismo.
- Através dos valores de proteínas totais foi possível verificar que a cepa utilizada foi capaz de excretar metabólitos no meio de cultivo para crescer e manter sua viabilidade celular.
- O biossurfactante produzido apresentou capacidade emulsificante mostrado pelos valores do índice de emulsificação, com valores próximos a 40%. Deste modo, outras pesquisas

empregando o biossurfactante produzido pela *C. violaceum* em processos de biorremediação podem verificar a aplicabilidade deste produto.

## REFERÊNCIAS

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potencial commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495 – 508, 2000.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R. TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 868-875, 2006.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231–236, 1999.

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

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

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

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

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

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

COOPER, DG. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**. v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology: Reviews**, vol. 61, p. 47-64, 1997.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **Molecular Cell Biology**. Scientific American Books. New York, 1990.

DURÁN, N.; FALIJON-ALARIO, A. Bacterial chemistry – I: studies of a potential phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 52, p. 297-302, 1998.

FORSYTH, W. G.; HAYWARD, A. C.; ROBERTS, J. B. Occurrence of poly-beta-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. **Nature**, v. 20, p. 182-190, 1958.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 483-496, 2002.

GRUBER, T.; CHMIEL, H.; KAPPEL, O.; STICHER, P.; FIETCHTER, A. Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis. In: KOSARIC, N. biosurfactants. **Surfactants Science Series**, v. 48, p. 157-173, 1993.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactants of MEL – A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 57-61, 2001.

ITO, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipides produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). **Journal of Antibiotics**, Tóquio, v. 24, n. 12, p. 855-859, 1971.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Bangalore: Current Science**, v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KIM, S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H.. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L - 417. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, p. 249-253, 2000.

KOCH, A. K.; KAPPEL, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 4212-4219, 1991.

LEVISAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ZUNDA, G.; GRIGISKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1141-1146, 2004.

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

PERREIRA, M.; PARENTE, J.A.; BATAUS, D.D.P.C.; SOARES, R.B.A. and SOARES, C.M.A. Chemotaxis and Flagellar genes of *Chromobacterium violaceum*, **Genetics and Molecular Research**, v.1, p. 92-101, 2004.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactantes. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 263-269, 1998.

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 356-360, 2002.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Laboratório Integrado de Águas de Mananciais e Residuárias (LIAMAR/CEFETCE), na pessoa do seu coordenador *Prof<sup>o</sup>. MSc. Raimundo Bemvindo Gomes*, pela permissão em usar este espaço laboratorial.