

## **Los biosurfactantes y la industria petrolera.**

Laura J. Raiger Iustman y Nancy I López\*

Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana, Departamento de Química Biológica. FCEyN-  
UBA

Intendente Güiraldes 2160. Pab 2, piso 4, lab QB-30 (C1428EGA) Buenos Aires, Argentina

[lri@qb.fcen.uba.ar](mailto:lri@qb.fcen.uba.ar)

Recibido el 04/12/2009. Aceptado el 22/12/2009.

\* Las autoras son docentes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, e Investigadoras del CONICET

### **Resumen**

El petróleo es un elemento clave para las actividades humanas como fuente de energía y como materia prima para la producción de diversos compuestos. Dos de los grandes problemas que la industria petrolera enfrenta son, por un lado, la contaminación que ella misma produce y por el otro, la baja eficiencia en la extracción del petróleo de sus reservorios naturales. Una de las técnicas de remediación de sitios contaminados se basa en el uso de microorganismos capaces de degradar el petróleo y sus derivados mediante la utilización de distintas estrategias tales como la bioaumentación o la bioestimulación. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos hace que estos compuestos sean poco accesibles y se adhieran fuertemente a las moléculas del suelo o sedimentos en ambientes acuáticos. Tanto para favorecer la degradación como para facilitar su extracción de los yacimientos, es importante aumentar su movilización y su solubilización en medios acuosos, y para ello se propone el uso de compuestos tensioactivos (surfactantes). Algunos microorganismos poseen la capacidad de sintetizar este tipo de compuestos, denominados biosurfactantes. Los biosurfactantes presentan varias ventajas con respecto a los surfactantes químicos, entre ellas su biodegradabilidad, baja toxicidad, biocompatibilidad, especificidad y la

amplia variedad de estructuras químicas disponibles. Estas características han permitido, en los últimos años, el desarrollo de técnicas de remediación y de recuperación asistida del petróleo residual que incluyen el uso de biosurfactantes, tanto a escala de laboratorio como a campo.

**Palabras clave:** Biosurfactantes. Biorremediación. Recuperación asistida del petróleo. Petróleo

## **Abstract**

Oil is a key element for human activities as an energy source and as feedstock for the production of several compounds. Two major problems from the oil industry are, on one hand, the pollution it produces and on the other, the low efficiency in the oil extraction from their natural reservoirs. One of the techniques for contaminated sites remediation is based on the use of microorganisms capable of degrading petroleum and its derivatives. However, the hydrophobic nature of oil makes these compounds not available to the degrading organisms. To promote degradation and to facilitate removal of the deposits, it is important to increase their mobilization and solubilization in aqueous media, and for this, the use of tensoactive compounds (surfactants) has been proposed. Some microorganisms have the ability to synthesize biosurfactants. The biosurfactants have several advantages over the chemical ones: biodegradability, low toxicity, biocompatibility, specificity and a wide variety of chemical structures. These features have allowed, in recent years, the development of remediation and residual oil recovery techniques involving the use of biosurfactants.

**Key words:** Biosurfactants. Oil Bioremediation. Microorganism Enhanced Oil Recovery (MEOR)

## **Introducción**

El petróleo y otros combustibles fósiles son la principal fuente de energía para las actividades humanas. Su utilización como fuente de energía y materia prima para la producción de diversos compuestos genera uno de los mayores problemas ambientales que debe enfrentar el mundo actual. Por ello, el conocimiento de los problemas derivados de la contaminación y la búsqueda de nuevas alternativas que contribuyan a la optimización en el uso de estos compuestos preservando el medio ambiente, así como el desarrollo de

nuevas metodologías para la depuración de ambientes contaminados constituyen un objetivo ecológico prioritario. En tal sentido, los microorganismos pueden ser actores importantes en relación al petróleo y sus derivados dado que, debido a su alta versatilidad metabólica, pueden ser utilizados tanto en procesos de extracción y recuperación de petróleo como en aquellos relacionados con la contaminación derivada del mismo.

Este trabajo intenta ampliar el conocimiento sobre el papel que juegan los biosurfactantes en la industria petrolera, resaltando la importancia de los organismos que los producen, como posibles agentes a ser utilizados en protocolos de biorremediación o de recuperación del petróleo residual en los yacimientos.

En nuestro laboratorio se están realizando investigaciones de estos compuestos obtenidos a partir de bacterias aisladas de ambientes naturales.

## **1. Problemas de la industria petrolera: contaminación y eficiencia de extracción**

Dos de los problemas más importantes que históricamente afectan a la industria petrolera son la alta contaminación ambiental que genera y la baja eficiencia de extracción del crudo de sus reservorios naturales.

En el caso de la contaminación ambiental, la misma ocurre cuando se producen pérdidas en los tanques, oleoductos y diversas instalaciones industriales o a partir de fallas o accidentes en los sistemas de almacenaje o de transporte. En esos casos, los hidrocarburos alcanzan aguas abiertas y suelos, pudiendo llegar a contaminar napas subterráneas y/o cursos de agua superficial.

Por otro lado, la extracción de hidrocarburos de sus reservorios naturales no es un proceso eficiente. Tanto es así que según la base de datos de Reservorios del Departamento de Energía de los Estados Unidos existen más de 600 reservorios que contienen más de 12.000 millones de barriles de petróleo irre recuperables. Si por algún mecanismo se pudiera extraer solo el 10% de ese petróleo residual, se estaría hablando de un incremento en 300 millones de barriles (1)

Actualmente se utilizan hasta tres etapas de extracción de petróleo, las cuales aumentan el rendimiento final pero elevan los costos. La etapa de extracción primaria es la más económica y se realiza aprovechando la presión natural del reservorio, la extracción secundaria depende del uso de bombas y/o inyección de gas, agua o vapor para extraer parte del petróleo residual adherido a las rocas del suelo. Aunque esta segunda extracción aumenta la recuperación del petróleo residual, más del 60% del crudo existente en un reservorio queda aun en el mismo (2,3), lo que hace al proceso poco eficiente. Existe, entonces, una tercera etapa de

extracción, denominada Recuperación Asistida del Petróleo o EOR por sus siglas en inglés (**Enhanced Oil Recovery**). Esta técnica utiliza distintos métodos para aumentar la presión en el reservorio y/o disminuir la viscosidad del petróleo.

Tanto para la remediación de los ambientes contaminados como para el proceso de EOR, se ha propuesto el uso de microorganismos. En el caso de EOR , cuando se utilizan microorganismos o los compuestos producidos por ellos, se lo denomina MEOR (**Microorganism Enhanced Oil Recovery**).

## **2. Microorganismos y la industria petrolera**

A pesar de que los ambientes naturales cuentan con sistemas de detoxificación naturales (proceso de atenuación natural), éstos pueden tardar mucho tiempo en lograrse, con el consecuente daño tanto para la flora y fauna local como para el ser humano. Por este motivo, en el caso de ambientes altamente contaminados, es necesaria la acción del hombre para acelerar este proceso. A esta intervención se la denomina remediación. En las últimas décadas del siglo XX y primeros años del siglo XXI, se comenzaron a utilizar organismos capaces de degradar hidrocarburos para remediar sitios contaminados. A este proceso se lo denominó biorremediación.

El estudio de la biorremediación ganó impulso luego del vertido de crudo del buque Exxon Valdez en Alaska el 24 de marzo de 1989 (4,5,6). En general se basa en dos mecanismos: la **bioestimulación**, que consiste en agregar fertilizantes fosforados y nitrogenados de manera de otorgar aceptores de electrones y nutrientes al ambiente y así favorecer el aumento de la carga microbiológica autóctona, y la **bioaumentación**, que consiste en inocular cepas o consorcios de microorganismos especialmente formulados para sanear un determinado sitio (7).

Uno de los grandes problemas que tiene tanto la biorremediación como la MEOR es, justamente, la baja biodisponibilidad de los hidrocarburos debido a su escasa solubilidad en agua y su alta adherencia a las moléculas del suelo.

El uso de agentes tensioactivos, tanto sintéticos como biológicos, aumentaría la disponibilidad de los hidrocarburos ya sea para su mejor extracción o para su biodegradación.

## **3. Los surfactantes como agentes para mejorar la biodisponibilidad**

El término surfactante proviene de las palabras inglesas **Surface Active Agents**.

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que poseen la capacidad de interactuar con compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos a la vez y por lo tanto, ubicarse en la interfase de los mismos.

Esta afinidad por las interfases es lo que les otorga sus principales características:

- disminuir la tensión superficial – en el caso del agua puede reducirse de 72 mN/m a cerca de 27 mN/m (8),
- reducir la tensión interfacial y
- aumentar la solubilidad.

Muchos microorganismos son capaces de sintetizar este tipo de compuestos (ver Tabla 1), y en ese caso, se los denomina **Biosurfactantes**.

Los biosurfactantes se pueden clasificar según su peso molecular o su naturaleza química (Tabla 1). Los compuestos de bajo peso molecular son generalmente lipopéptidos, glicolípidos, aminoácidos modificados y ácidos grasos, mientras que los de alto peso molecular son polímeros extracelulares compuestos por polisacáridos, lipopolisacáridos, proteínas, lipoproteínas o una mezcla compleja de estos biopolímeros (9).

**Tabla 1 Clasificación y origen de diferentes biosurfactantes**

Esta tabla fue modificada a partir de la publicada por Mulligan (10)

Tipo de surfactante	Organismos que lo producen	Parte hidrofóbica	Parte Hidrofílica
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>	Ácido 3-b-hidroxidecanoico	1 o 2 moléculas de ramnosa

Trehalolípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp.	Ácido C6-C6' micólico	Trehalosa
Soforolípidos	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>	Ácido 3- hidroxiácido	Soforosa
Celobiolípidos	<i>Ustilago maydis</i>	Ácido graso	Celobiosa
Lípidos polioles	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>	Ácido graso	Polioxipropilenglicol
Diglicosil diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>	2 ácidos grasos	di-hidrato de carbono+ glicerol
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida lipolytica</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Oligosacárido+ péptido
Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp.	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Lichenysin A, Lichenysin B	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Ornitina, lisina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Grupos amino y grupos ácido
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.	Ácido graso	Grupo fosfato
Sulfonilípidos	<i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	Ácido graso	Grupo sulfonilo
Ácidos grasos (ácido)	<i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Penicillium</i>	Ácido graso	

corinomicólico, espiculispórico, etc.)	<i>spiculisporum, Corynebacterium lepus, Arthrobacter paraffineus, Talamyces trachyspermus, Nocardia erythropolis</i>	
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Complejo de proteínas y polisacáridos aniónicos de PM aprox. $1 \times 10^6$ (11)
Streptofactin	<i>Streptomyces tendae</i>	Proteína hidrofóbica de alto peso molecular
Surfactantes particulados	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N. <i>Pseudomonas marginalis</i>	Vesículas extracelulares , Células bacterianas completas con alto grado de hidrofobicidad en su superficie (12)
Biosur PM	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Complejo de proteínas (50%) y polisacáridos (12 a15%) (13).

Estos bioproductos poseen amplias ventajas en comparación con los surfactantes químicos, como:

- la biodegradabilidad,
- la baja toxicidad y biocompatibilidad – lo que permite su uso en la industria farmacéutica y de alimentos,
- la capacidad de sintetizarse a partir de fuentes de carbono relativamente baratas o a partir de residuos de otras industrias,
- la amplia variedad de estructuras químicas disponibles entre los distintos biosurfactantes
- la especificidad, ya que dependiendo de su fórmula molecular, tendrán grupos funcionales diferentes que le confieren mecanismos de acción específicos (14)

La efectividad de un surfactante se puede establecer en base a distintos parámetros, todos ellos relacionados con su capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos y disminuir la tensión superficial y/o interfacial.

Unos de los parámetros a tener en cuenta es la **Concentración Micelar Crítica** o **CMC**, y la **disminución de la tensión superficial (TS) e interfacial (TI)**.

La **CMC** es la concentración mínima de un agente surfactante capaz de formar micelas (Figura 1). Estas micelas se producen cuando la parte hidrofóbica del surfactante, al ser incapaz de formar puentes de

hidrógeno con las moléculas de agua, produce un aumento de la energía libre del sistema. Una manera de aliviar este aumento, es aislar la región hidrofóbica interaccionando con otras superficies, asociándose a otros compuestos hidrofóbicos o formando vesículas (micelas) en las que la región lipofílica se sitúa en el centro y la hidrofílica hacia fuera, formando los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Cuanto menor sea la CMC, más eficiente es el surfactante en cuestión.

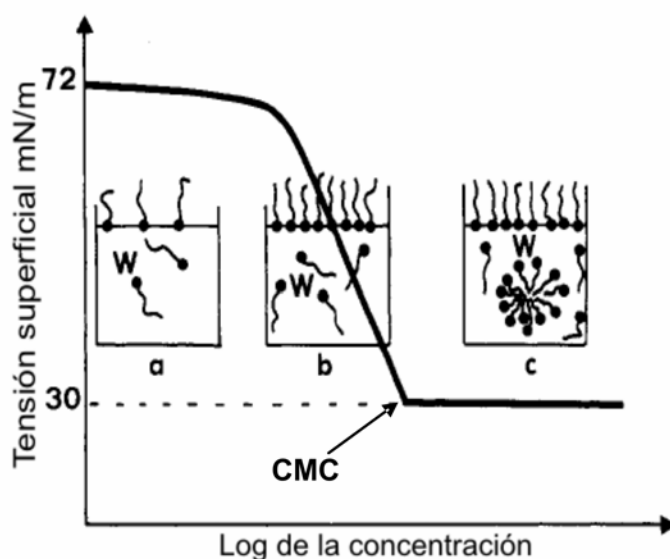
La formación de micelas mixtas entre surfactantes y otros compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos favorecen la dispersión del mismo en medio acuoso aumentando la biodisponibilidad y por consiguiente la posibilidad de degradación.

La **tensión interfacial (TI)** entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro, de esta manera, la tensión interfacial entre dos líquidos está relacionada con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. (15) Para disminuir la TI, los surfactantes actúan como un “puente” formando una tercera fase de “microemulsion” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo (16)

En el caso de la **tensión superficial** (tensión presente en la interfase liquido-aire), los surfactantes la disminuyen debido a que interfieren en la formación de puentes de hidrogeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas (Figura 1).

Tanto la tensión superficial, como la CMC dependen del pH, de la temperatura y de los demás solutos presentes en el medio acuoso.

La Tabla 2 muestra la disminución de la tensión superficial del agua destilada en presencia de distintos surfactantes, naturales o químicos y la CMC de esos agentes en agua destilada.



**Figura 1. Efecto de la concentración de surfactante en la tensión superficial**

Figura modificada a partir de la publicada en De Gennes & Taupin (17).

a, b y c muestran la ubicación de los surfactantes en la interfase y la formación de micelas a medida que aumenta la concentración del agente tensioactivo.



**Tabla 2: Efecto de diferentes biosurfactantes sobre la tensión superficial del agua destilada.**

Surfactante	Tensión superficial (mN/m)	CMC (mg/l)	Referencias
Ninguno- (agua)	72	Nd	8
Glicolípido	26.8	54	8
Trehalosa dicoriomicolato	43	0.7	18
Trehalosa tetraester	24.1	25	19
Ramrólpidos	28.8	110	20
Sofrolípidos	30-60	5-80	21
Surfactina	27	23	8
Viscosin	28	54	22.
SDS	37	2120	8
Tween	30	600	8

#### **4. Los biosurfactantes y la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos**

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos, es necesario aumentar la biodisponibilidad de los mismos de manera que sean accesibles a los organismos encargados de su degradación. Este objetivo puede alcanzarse con el agregado de surfactantes químicos o detergentes. Sin embargo, el uso de estos compuestos agrega un contaminante extra (23). Este inconveniente se solucionaría empleando biosurfactantes, ya que son compuestos amigables para el ambiente.

## Contaminación en suelos

La penetración de los hidrocarburos en el suelo es un proceso complejo que depende de factores tanto físicos, químicos como biológicos. (24,25)

Una forma de aumentar la biodisponibilidad es lograr que estos contaminantes pasen a una interfase acuosa por medio de la desorción de los hidrocarburos de las moléculas del suelo y la solubilización en medio acuoso (8,24,26,27).

En los últimos años se han desarrollado técnicas de remediación que incluyen el uso de biosurfactantes, tanto a escala de laboratorio como a campo.

La elección del surfactante o mezcla de surfactantes a ser utilizados en remediación de suelos depende de varios factores como el costo, la biodegradabilidad, la toxicidad, la adsorción del surfactante a las moléculas del suelo, la concentración efectiva – que debe ser menor al 3%-, la dispersión en suelo y la disminución en la tensión superficial que éste produzca (25). En general estos bioproductos son igual de efectivos en la solubilización de los contaminantes que los surfactantes químicos, pero al ser biodegradables y tener una CMC menor, casi no se producen cambios significativos en la estructura del suelo tratado (28).

Los biosurfactantes más estudiados en biorremediación son los ramnolípidos, sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactina (29), los lipopéptidos (30) y los soforolípidos (31).

En estudios a escala de laboratorio, Yin y colaboradores (32) demostraron que el uso de ramnolípidos resultaba más eficiente para la remediación de efluentes contaminados con crudo que los surfactantes comerciales como Tritón o Tween. Por otro lado, Guo y Mulligan (33) demostraron que los ramnolípidos son capaces de remover más del 90% del estireno adsorbido en una mezcla compuesta por 66.6% de tierra y 33.3% de arena.

A escala de campo, uno de los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es el *soil-washing*, que literalmente implica el lavado del suelo contaminado con una solución acuosa del surfactante, sin el agrado de microorganismos en el proceso (34) Este tratamiento es relativamente rápido, de costo moderado y permite tratar grandes extensiones de suelo contaminado y además recuperar parte del hidrocarburo ya sea *in situ* como *ex situ* (28).

Por otro lado, se estudió el uso de biosurfactantes o de cepas productoras de los mismos en los protocolos de biorremediación *in situ*, ya sea como agregado en los formulados de aumentación o bioestimulación o

directamente introduciendo cepas que produzcan surfactantes, sean o no capaces de degradar los hidrocarburos contaminantes (27).

### **Contaminación de aguas abiertas y napas subterráneas**

La forma en que actúan los surfactantes en la remediación de aguas contaminadas con hidrocarburos se basa en dos métodos: el primero de ellos es la solubilización y el segundo método es por movilización. En este caso, el agente surfactante se une a las moléculas adsorbidas a una superficie porosa (el lecho arenoso de las costas o las arcillas de las napas subterráneas) disminuyendo su tensión interfacial, separándolas de la matriz y aumentando la biodisponibilidad para su remediación o facilitando su remoción por medios físicos (35).

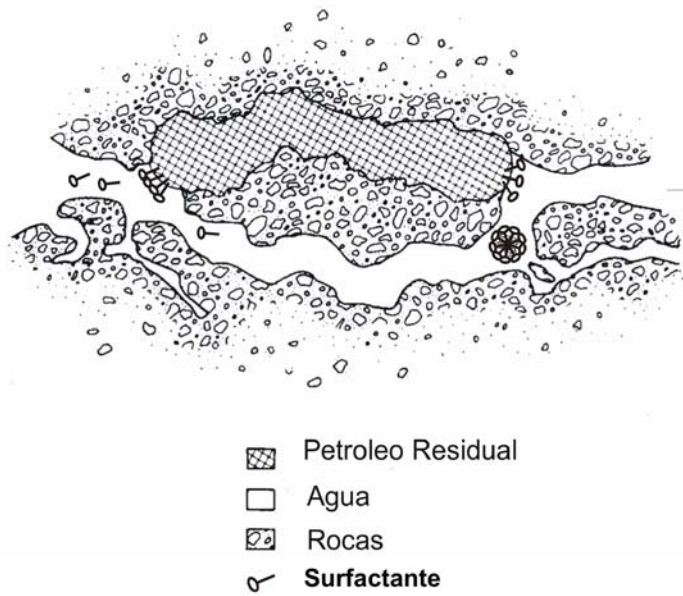
Aunque en la actualidad aun son escasos los estudios a campo en el tratamiento de aguas contaminadas comparados con los tratamientos de suelos, se ha demostrado que el agregado de surfactantes aumenta la biodegradación de diferentes hidrocarburos (crudo, diesel, etc.) en ambientes marinos, aportando resultados similares a los obtenidos con agentes químicos, pero con una toxicidad mucho menor (36,37).

### **5. Biosurfactantes para la recuperación de petróleo residual (MEOR)**

Como se indicó en el punto 1, la extracción del petróleo de los yacimientos es muy poco efectiva. La existencia del petróleo residual en los reservorios se debe a los mismos factores que hacen que la remediación de los sitios contaminados sea dificultosa, aunque en estos casos, la principal dificultad se debe a la alta adherencia de los hidrocarburos a las moléculas porosas del suelo: arcillas, rocas, arena, etc. y a la viscosidad del fluido (38).

El agregado de surfactantes forma parte del arsenal de herramientas con las que se intenta mejorar la extracción del crudo atrapado en los yacimientos.

La Figura 2 muestra un esquema de un reservorio con petróleo residual adherido a las moléculas del suelo y la acción de los surfactantes



**Figura 2. Esquema de suelo reteniendo petróleo.** Imagen modificada a partir de la publicada por de Reed and Healy (39). Se observa el efecto de los agentes surfactantes que al disminuir la tensión interfacial líquido-sólido y líquido- líquido permite la movilización y solubilización del hidrocarburo retenido

La producción de biosurfactantes para la recuperación asistida de petróleo puede hacerse *ex situ* o *in situ*. En el primer caso, una vez producido, el compuesto debe ser purificado y/o concentrado e inyectado en el reservorio (14). Una alternativa interesante es la producción *in situ*. Para ello se utilizarían técnicas de de estimulación, o sea, agregando nutrientes específicos con el fin de estimular el desarrollo de la microflora nativa capaz de sintetizar surfactantes, o de *aumentación* (incorporación del microorganismo seleccionado).

El uso de microorganismos en la explotación de petróleo es controversial, ya que aunque muchos de ellos son útiles, como los que son capaces de liberar gases como el metano, sintetizar ácidos, solventes, biopolímeros, y por supuesto biosurfactantes, muchos otros son perjudiciales, como las bacterias sulfato reductoras (40). Por ello, la selección del o los microorganismos a ser incorporados debe ser cuidadosamente estudiada. No sólo hay que asegurarse de no introducir organismos perjudiciales, sino que además hay que tener en cuenta que las condiciones dentro del yacimiento difieren significativamente de las condiciones óptimas de cultivo y producción de surfactantes, por lo que la cepa a incorporar debe ser analizada en cuanto a su resistencia a temperaturas mayores de 85°C, alta salinidad, pH extremo, metales pesados y sobre todo, la baja aerobiosis (38).

## 6. Conclusiones

- El descubrimiento de agentes tensioactivos de origen microbiano (biosurfactantes) que aumentan la biodisponibilidad de los hidrocarburos y no dañan el medio ambiente ha significado un gran avance tanto para los procesos de extracción de petróleo residual de los yacimientos como para los de biodegradación de ambientes contaminados.
- La combinación de estrategias eficientes de biodegradación y aplicación de biosurfactantes constituyen elementos claves para abordar la solución de problemas ecológicos derivados de los hidrocarburos en los cuales los microorganismos tienen un papel esencial.

## 7. Bibliografía

1. McInerney MJ, Knapp RM, Duncan K, Simpson DR, Youssef N, Ravi N, Folmsbee MJ, Fincher T, Maudgalya S, Davis J, Weiland S. (2007) Development of an In Situ Biosurfactant Production Technology for Enhanced Oil Recovery. DOE Scientific and Technical Information FC26-04NT15522 DOI: 10.2172/943328
2. U.S. Department of Energy. (2006). Undeveloped domestic oil resources: the foundation for increasing oil production and a viable domestic oil industry,
3. Bryant RS. (1987) Potential uses of microorganisms in petroleum recovery technology. Proc. Okla. Acad. Sci. 67: 97-104.
4. Elashvili HI, Valdes JJ , Kamely D & Chakrabarty AM. (1990) Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant S Nature Biotechnology 8, 228–230
5. Pritchard PH and Costa CF. 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. Environ. Sci. Tech. 25: 372-379
6. Bragg JR, Prince RC, Harner EJ, Atlas RM. (1994). Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Nature 368:413-418
7. Calvo C., Manzanera M., Silva-Castro G.A., Uad I., Gonzalez-Lopez J. (2009), Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of The Total Environment 407: 3634-3640

8. Christofi, N. & Ivshina, I.B. (2002) Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology* 93: 915–929
9. Ron EZ and Rosenberng E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3: 229-236
10. Mulligan CN (2005) Environmental application for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133: 183-198
11. Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S and Ron EZ (1995), A new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl Environ Microbiol* 61: 3240–3244
12. Al-Araji L, Zaliha RN, Rahman RA., Basri M.Salleh AB. (2007) Microbial surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 2007 Vol. 15: 99-105*
13. Phale PS, Savithri HS, Rao NA, and Vaidyanathan CS. (1995). Production of biosurfactant “Biosur-Pm” by *Pseudomonas maltophilia* CSV89: characterization and role in hydrocarbon uptake. *Arch. Microbiol.* 163:424-431
14. Kosaric N. (1992) Biosurfactants in industry. *Pure & appl Chem* 64:1731-1737
15. Donahue DJ. and Bartell FE. (1952) The Boundary Tension at Water-Organic Liquid Interfaces. *J. Phys. Chem.* 56: 480-84
16. Ayirala SC, Rao DN. (2006) Solubility, miscibility and their relation to interfacial tension in ternary liquid systems. *Fluid fase equilibria* 249: 82-91
17. De Gennes PG, Taupin C. (1982) Microemulsions and the Flexibility of Oil/Water Interfaces. *J. Phys. Chem.* 86: 2294–2304.
18. Kretschmer A, Bock H, Wagner F (1982) Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n alkanes. *Appl. Env. Microbiol* 44: 864-870
19. Tuleva B, Christova N, Cohen R, Antonova D, Todorov T, Stoineva I. (2009) Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56 *Process Biochemistry* 44:135-341
20. Chayabutra C, Wu J and Ju LK. (2001) Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol Bioeng* 72:25–33

21. Lang S, Brakemeier A, Heckmann R, Spöckner S and Rau U. (2000) Production of native and modified sophorose lipids. *Chimica Oggi/Chem Today* 18:76–79.
22. Saini HS, Barragán-Huerta BE, Lebrón-Paler A, Pemberton JE, Vázquez RR, Burns AM, Marron MT, Seliga CJ, Gunatilaka AA, Maier RM. (2008) Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *J. Nat. Prod* 71:1011-1015
23. Bognolo G. (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 152:41–52.
24. Volkering F, Breure AM, Rulkens WH. (1998) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8: 401–417
25. Paria S. (2008) Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv. Colloid Interface Sci.* 138: 24–58
26. Mulligan CN, Yong RN, Gibas BF. (2001) Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.* 60: 371–380.
27. Ron EZ and Rosenberg E. (2002) Biosurfactant and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 249–252
28. Urum K, Grigson S, Pekdemir T, McMenemy S. (2006). A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* 62: 1403-1410
29. Olivera NL, Commendatore MG, Moran AC and Esteves JL. (2000) Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25: 70–73
30. Tecon R and van der Meer JR. (2009) Effect of two types of biosurfactants on phenanthrene availability to the bacterial bioreporter *Burkholderia sartisoli* strain RP037. *App Microbiol Biotech-* online DOI 10.1007/s00253-009-2216-0
31. Schippers C, Geßner K, Muller T and Scheper T. (2000) Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture, *Journal of Biotechnology* 83:189–198

32. Yin, J. Qiang YJ, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, Zhang N and He B. (2008). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 from oil-containing wastewater, Proc. Biochem. 44: 302–308
33. Guo Y. and Mulligan CN. (2006) Combined treatment of styrene-contaminated soil by rhamnolipid washing followed by anaerobic treatment. Chapter 1. In: R.C. Hudson, Editor, Hazardous Materials in Soil and Atmosphere, Nova Science Publishers, New York, pp. 1–38
34. Urum K and Pekdemir T.(2004) Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere 57: 1139–1150
35. Harwel JH, Sabatini DA and Knox RC. (1999) Surfactants for ground water remediation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 151:255-268
36. Mulligan CN (2009) Recent advances in the environmental application of biosurfactant. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14: 372-378
37. Saeki H, Sasaki M, Komatsu K, Miura A and Matsuda H.(2009) Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058 *Bioresource Technology* 100:572-577
38. Sen R. (2008) Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR Progress in Energy and combustión. *Science* 34: 714– 724.
39. Reed EL and Healy RN. (1977) in Improved oil recovery by surfactant and polymer flooding. D.O. Shah and R.S. Schechter. Eds. Academia Press. Pp 383-347
40. Catherine B and Hilary LS. (1997) The bad guys and the good guys in petroleum microbiology, *Oilfield Review* 9:17–25.