

Produção de biossurfactante por *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. a partir de diferentes óleos como fonte de carbono

Production of biosurfactant by *Lysinibacillus* sp. and *Bacillus* sp. from different oils as carbon source

Graziely Aparecida Mendes de Almeida¹, Maria dos Remédios Araújo Vieira Neta¹,
Gabriela Fiori da Silva¹, Pierre Ferreira do Prado²
Mônica Aparecida de Almeida¹, Iolanda Cristina Silveira Duarte¹

¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos (SP-264), km 110, 18052-780, Sorocaba, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista, campus Sorocaba, Avenida Três de Março, nº 511 no Alto da Boa Vista, Sorocaba, SP, Brasil.
e-mail: iolanda@ufscar.br, p.prado@unesp.br

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas multifuncionais produzidas por microrganismos e podem apresentar vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, maior redução da tensão superficial e alta diversidade química. No entanto, a produção em escala comercial ainda é escassa devido ao elevado custo dos substratos utilizados. Portanto, no presente trabalho foi avaliada a produção de biossurfactantes utilizando diferentes óleos como fonte de carbono, como óleo de soja, óleo de fritura, óleo diesel, óleo lubrificante novo e usado, a partir de dois gêneros de bactérias isoladas de lodo indústria de cosméticos e solo contaminado com óleo diesel, *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. respectivamente. Estas foram identificadas por sequenciamento do fragmento do gene RNAr 16S e mantidas sob refrigeração a 4 °C em tubos de ensaio, com ágar triptona de soja. Os ensaios de produção foram realizados sob agitação de 200 rpm a 30 °C com duração de 7 dias. A produção de biossurfactante foi analisada pela atividade emulsificante, índice emulsificação e por colapso da gota. As bactérias utilizadas produziram biossurfactante em todos os tipos de óleos testados. O óleo de soja mostrou-se o melhor substrato para produção de biossurfactante a partir do *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. com índice de emulsificação de 50 % e 46,63 %, respectivamente.

Palavras-chave: emulsificantes; bactérias; fontes alternativas; fermentação.

ABSTRACT

Biosurfactants are multifunctional molecules produced by microorganisms and have some advantages compared to synthetic surfactants, such as low toxicity, high biodegradability, improved tensoactivity and chemical diversity. However, commercial scale production is not viable due to the high cost of the substrates used. Therefore, in the present work we evaluated the production of biosurfactants using different oils as carbon source, such as soybean oil, frying oil, diesel oil, new and used lubricating oil, from two genera of bacteria isolated from sludge cosmetics industry and soil contaminated with diesel oil, *Lysinibacillus* sp. and *Bacillus* sp. respectively. These were identified by sequencing the 16S rRNA gene fragment and kept under refrigeration at 4 °C in test tubes with tryptone soy agar. The production was carried out under agitation at 200 rpm at 30 °C for 7 days. The biosurfactant production was analyzed by emulsifying activity, emulsification index and drop collapse. The bacteria used produced biosurfactant in all types of oils tested. Soybean oil was the best substrate for the production of biosurfactant from *Lysinibacillus* sp. and *Bacillus* sp. with an emulsification index of 50% and 46.63%, respectively.

Keywords: Emulsifiers; bacterium; alternative sources; fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes ou biotensoativos são surfactantes de origem microbiana, produzidos por bactérias, leveduras e fungos [1, 2]. São compostos anfipáticos, contendo grupos hidrofóbicos (apolares) e hidrofílicos (polares) [3], que reduzem a tensão superficial ou interfacial entre duas fases líquidas [4, 5]. Essas moléculas orgânicas complexas podem apresentar propriedades, composição química e tamanhos moleculares diversos [6], sendo assim, classificados com base na estrutura da biomolécula e espécie produtora [1, 7].

O gênero *Bacillus* é um dos mais estudados para produção de lipopeptídios [3, 8]. As espécies pertencentes a esse gênero produzem diferentes tipos desse biossurfactante como bacilomicinas [9], micosubtilionas [10], fengicinas [11], iturinas e surfactina [12], sendo este último, considerado como um dos mais interessantes biossurfactantes, pois apresentam citotoxicidade contra vários tipos de câncer, inibindo o crescimento celular, o ciclo celular, apoptose e interrupção da metástase, assim evitando a progressão da doença [13]. Além disso, a surfactina pode ser usada como agente de controle biológico de patógenos, devido as suas propriedades antibacterianas e antivirais [14].

Espécies do gênero *Lysinibacillus* também apresentam potencial para a produção de lipopeptídios, como o *Lysinibacillus chungkukjangi*, a qual produz lipopetídeos que tiveram suas propriedades recentemente descobertas, com possibilidade de aplicação desse biossurfactante em vários ramos da indústria tais como: alimentício, farmacêutico e recuperação de petróleo [15].

A maioria dos surfactantes utilizados atualmente, provêm da indústria petroquímica, entretanto com os recorrentes problemas ambientais [16], a demanda por surfactantes biológicos tem aumentado. O uso de biossurfactantes como alternativas aos surfactantes sintéticos foi impulsionada pelo rápido progresso da biotecnologia [17, 18] e também por serem compostos naturais que oferecem uma série de vantagens sobre os surfactantes sintéticos [5, 19], como o potencial de biodegradabilidade, baixa toxicidade, solubilização de hidrocarbonetos, estabilidade térmica [20], ação antimicrobiana [7], antibacteriana [21], antifúngica [22], antiviral [14] podendo ser sintetizados a partir de matérias-primas de baixo custo, gerando uma economia em torno de 50% na produção final de biossurfactantes [5].

As propriedades e características dos biossurfactantes fazem com que este seja considerado uma molécula versátil podendo ser aplicado na indústria agrícola, cosmética e de detergentes [23], na biorremediação e biodegradação, entre muitas outras [19, 24]. Porém o alto custo para sua obtenção impede sua viabilidade para produção e aplicação em larga escala. Como estratégia para a redução dos custos da produção de biossurfactante, os subprodutos e os resíduos da agroindústria têm sido avaliados como fontes de carbono alternativas [5], favorecendo, também, a minimização do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses resíduos no ambiente [25].

Assim, com o intuito de prospectar a produção de biossurfactante com baixo custo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as bactérias *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. utilizando óleo de soja, óleo de fritura, óleo diesel, óleo lubrificante novo e usado como fontes de carbono para produção de biossurfactante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia foi desenvolvida de acordo com o fluxograma operacional representado na Figura 1.

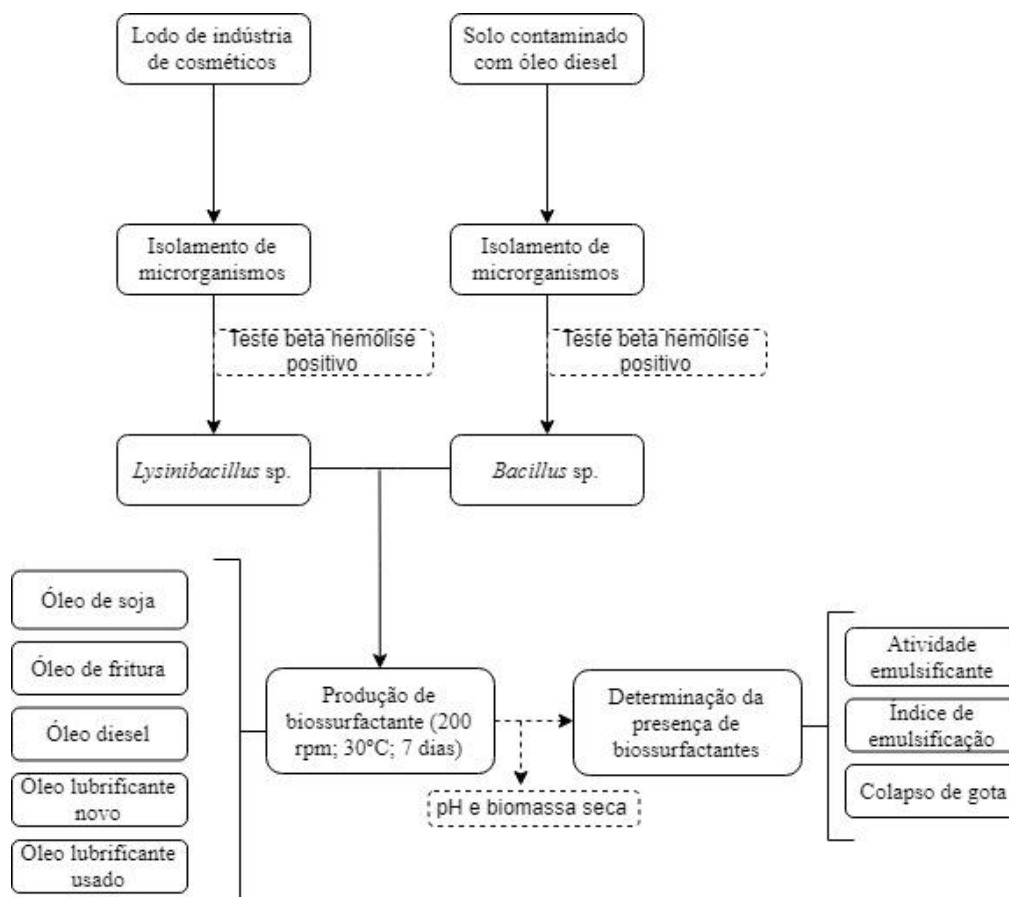


Figura 1: Fluxograma operacional.

2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram: *Lysinibacillus* sp., isolado de amostras de lodo do reservatório de uma indústria de insumos cosméticos, situada na cidade de Sorocaba e *Bacillus* sp. isolado de solo contaminado com óleo diesel, obtido na cidade de Tatuí, ambas as cidades estão situadas em São Paulo, Brasil. As bactérias foram avaliadas por testes de beta hemólise e o resultado foi positivo para produção de biossurfactantes.

A identificação foi realizada por sequenciamento do fragmento do gene RNAr 16S. A metodologia consistiu na extração do DNA genômico diretamente das culturas, segundo protocolo descrito por VAN SOOLINGER *et al.* [26]. Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados para a reação de PCR foram p10f e p1100r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias. Os produtos das ampliações foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI3500XL Series (*Applied Biosystems*). Os primers utilizados para o sequenciamento foram p10f e p1100r. As sequências obtidas foram comparadas com as bases de dados do Genbank e do RDP.

2.2 Produção do inóculo

A padronização do inóculo para os ensaios de produção de biossurfactantes foi realizada em solução salina (0,9%) e a absorbância foi verificada em espectrofotômetro através da turbidez observada em um comprimento de onda de 550 nm, que correspondeu a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL [27].

2.3 Produção de biossurfactante

O meio de produção de biossurfactante (controle) foi composto por (em g/L): extrato de levedura (0,2), peptona (1), glicose (5), NaNO₃ (5), K₂HPO₄ (1), MgSO₄ (0,5), FeSO₄.7H₂O (0,01), KCl (0,03), CaCl₂ (0,02), KH₂PO₄ (0,8) e 1 % de óleo. Os óleos testados como fonte de carbono foram: óleo de soja, óleo de fritura, óleo diesel, óleo lubrificante de motor novo e óleo lubrificante de motor usado. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. A fermentação foi realizada em frascos reagente de 250 mL contendo 49,0

mL do meio de cultura e 1 mL do inóculo. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm, durante 7 dias [28].

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Determinação da presença de biossurfactante

Amostras do meio de cultura fermentado foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min a 20 °C, para remoção das células bacterianas. O sobrenadante foi submetido às análises de atividade emulsificante, índice de emulsificação e teste de colapso de gota.

2.4.2 Atividade emulsificante e Índice de emulsificação (%)

A atividade emulsificante foi determinada a partir de 3,5 mL do sobrenadante com adição de 2 mL de tolueno e, após agitação em vortex, foi realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 540 nm [29].

A determinação do índice de emulsificação foi realizada a partir da mesma mistura de sobrenadante e tolueno, mantida em repouso por 24 h conforme o método descrito por BICCA *et al.* [30].

Amostragens do sobrenadante foram realizadas no tempo inicial e após 24 h para identificar a estabilidade da emulsão. O índice de emulsificação (E_{24}) foi calculado de acordo com a Equação 1.

Onde: I % = índice de emulsão (%); $A_{emulsão}$ = altura da camada emulsão (cm); A_{total} = altura total (cm).

$$I \% = \frac{A_{emulsão}}{A_{total}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.3 Colapso da gota

Para determinar o colapso de gota utilizou-se microplacas de 96 poços rasos, untados com 2 µL de óleo de motor 10W-40, mantidas em repouso por 24 h. Após o repouso 5 µL do sobrenadante foram transferidos para cada um dos poços e o espalhamento das gotas foi avaliado após 2 min. O resultado foi considerado positivo quando visualmente se inferiu o espalhamento da gota [31].

2.4.4 Biomassa Seca

Ao final dos ensaios de produção, foram centrifugados 15 mL da cultura (4000 rpm, 20 min a 20° C), o precipitado formado foi retirado e colocado em placas de Petri (previamente pesadas) e levadas a estufa a 105° C e pesadas após 24 h ou até peso constante.

2.4.5 Determinação do pH

Determinação do pH foi realizada no início e no final da fermentação, através de leitura direta em phmetro digital.

3. RESULTADOS

O maior índice de emulsificação foi o obtido com o óleo de soja como fonte de carbono, enquanto que com o óleo lubrificante usado foi observado o menor índice (Figura 2), com os demais substratos o índice de emulsificação para o *Bacillus* sp. variou entre 44 a 46 %, e de 30 a 50 % para o *Lysinibacillus* sp.

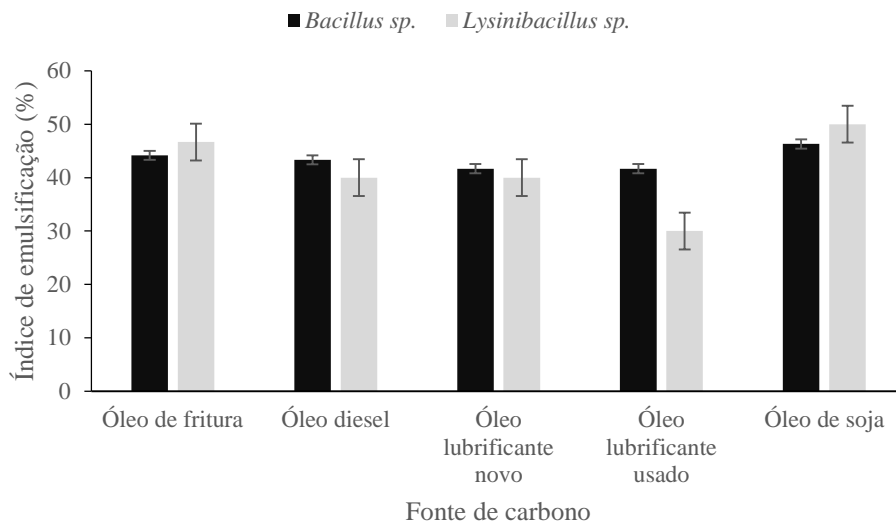


Figura 2: Índices de emulsificação (%) obtidos com as diferentes fontes de carbono.

A quantificação de biomassa seca bacteriana proveniente das cepas *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sp.* Esta apresentada na Tabela 1. Verificou-se que o caldo proveniente da fermentação com *Lysinibacillus sp.* e o óleo de soja como fonte de carbono, apresentou biomassa seca de 1,4 mg/L e índice de emulsificação em 50%, em cultivo com óleo lubrificante usado foi de 330,0 mg/L e o índice de emulsificação de 30%. Para o *Bacillus sp.* a biomassa seca foi de 70,0 mg/L proveniente de óleo de soja e de 50,0 mg/L para óleo lubrificante usado com índices de emulsificação em torno de 40 %.

A atividade emulsificante do *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sp.* esta apresentada na Tabela 2, onde observou-se que o máximo de atividade foi de 1,03 por *Bacillus sp.* e 0,761 com *Lysinibacillus sp.* Para ambos os gêneros a fermentação com óleo lubrificante novo apresentaram as menores atividades emulsificantes (0,057 e 0,104).

Na análise conjunta dos dados verificou-se que o óleo de soja, seguido de óleo de fritura foram as melhores fontes de carbono para produção de biossurfactante utilizando a cepa de *Lysinibacillus sp.*

Tabela 1: Biomassa seca (mg/L) do precipitado das bactérias *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sp.* nas diferentes fontes de carbono.

MICROORGANISMO	ÓLEO DE SOJA	ÓLEO DE FRITURA	ÓLEO DIESEL	ÓLEO LUBRIFICANTE NOVO	ÓLEO LUBRIFICANTE USADO
<i>Bacillus sp.</i>	1,6	130,0	70,0	310,0	50,0
<i>Lysinibacillus sp.</i>	1,4	200,0	70,0	120,0	330,0

Tabela 2: Atividade emulsificante (%) do sobrenadante livre de células

MICROORGANISMO	ÓLEO DE SOJA	ÓLEO DE FRITURA	ÓLEO DIESEL	ÓLEO LUBRIFICANTE NOVO	ÓLEO LUBRIFICANTE USADO
<i>Bacillus sp.</i>	0,37	0,37	1,03	0,057	0,221
<i>Lysinibacillus sp.</i>	0,761	0,243	0,741	0,104	0,146

O biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. e *Lysinibacillus* sp. em todos os óleos testaram positivo para o colapso de gota e a partir do resultado dessa análise qualitativa inferiu-se a propriedade tensoativa.

A determinação do pH foi realizada em duplicata após cada período de fermentação. Nos valores do pH do sobrenadante proveniente da fermentação dos meios de cultura em diferentes fontes de carbono, verificou-se que houve variação para os cinco substratos (Tabela 3).

Tabela 3: Medidas de pH ao final das fermentações de *Bacillus* sp. e *Lysinibacillus* sp. em cada fonte de carbono.

MICROORGANISMO	ÓLEO DE SOJA	ÓLEO DE FRITURA	ÓLEO DIESEL	ÓLEO LUBRIFICANTE NOVO	ÓLEO LUBRIFICANTE USADO
<i>Bacillus</i> sp.	7,4	6,7	8,2	7,9	7,5
<i>Lysinibacillus</i> sp.	6,0	5,6	6,1	7,9	7,9

O menor pH foi observado no ensaio com óleo de fritura. O pH das fermentações utilizando óleo de soja como fonte de carbono, que apresentou melhor atividade emulsificante, variou entre as espécies estudadas. O pH da fermentação com óleo diesel mostrou uma leve alcalinização e o pH do óleo de fritura apresentou uma leve acidez em relação as demais fontes de carbono.

4. DISCUSSÃO

Os diferentes óleos avaliados neste trabalho podem ser usados como substratos para a produção de biossurfactante por *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. e conseqüentemente reduzir os custos da produção. De acordo com a literatura, isolados que apresentam índice de emulsificação a partir de 40% são promissores para produção de biossurfactantes, pois a propriedade de interesse do biossurfactante é sua capacidade de emulsionar líquidos não miscíveis e formar emulsões estáveis [32].

Entre as cinco fontes de óleos testadas, para produção de biossurfactante pelos isolados de *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. o óleo de soja destacou-se com o maior índice de emulsificação, provavelmente esse resultado foi devido a estruturas orgânicas simples tais como ácidos graxos, cuja cadeia contém 8 a 20 átomos de carbono, que são facilmente metabolizáveis [33].

A produção de biossurfactante por *Lysinibacillus* sp. utilizando o óleo lubrificante usado apresentou o menor índice de emulsificação. Neste presente estudo não foi determinado a presença de metais neste óleo, entretanto, esse substrato normalmente apresenta concentração elevada de metais, que podem afetar os microrganismos [34]. De acordo com SADLER e TRUDINGER [35] dependendo da concentração de metais os microrganismos são afetados de diferentes formas causando alterações morfológicas e bioquímicas, podendo inibir o crescimento microbiano ou até mesmo causar a morte microbiana. Embora a concentração de metais neste óleo seja superior ao encontrado no óleo lubrificante novo, este substrato é muito estudado como fonte de carbono para distintas espécies bacterianas [36], pois apesar dos metais o óleo lubrificante usado apresenta em sua composição hidrocarbonetos [32], o óleo diesel também apresenta hidrocarbonetos em sua composição, sendo bastante relatado para prospecção de biossurfactante [37, 38].

A presença de hidrocarbonetos nos substratos é importante, pois eles estão envolvidos na síntese dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos das moléculas de biossurfactante. DESAI e BANAT [32] relataram que a síntese das porções hidrofóbicas e hidrofílicas, ocorre por duas vias metabólicas primárias usando hidrocarbonetos e carboidratos, respectivamente. Diversos conjuntos específicos de enzimas reguladoras estão envolvidos na síntese das duas porções das moléculas de biossurfactante. Há diferentes possibilidades para a síntese das porções hidrofóbicas e hidrofílicas das moléculas biossurfactante e seu acoplamento: (1) as porções hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas por duas vias independentes; (2) a porção hidrofílica é sintetizada enquanto a síntese da porção hidrofóbica é induzida pelo substrato; (3) a porção hidrofóbica é sintetizada, enquanto a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato; e (4) a síntese de ambas as porções hidrofóbicas e hidrofílicas é dependente do substrato.

MNIF *et al.* [39] verificaram a produção de biossurfactante para *Lysinibacillus fusiformis* utilizando como substrato o petróleo bruto a 1% e obtiveram um índice de emulsificação de 72%, e mostraram que essa bactéria pode ser utilizada para biorremediação em locais contaminados com hidrocarbonetos. SILVA *et al.* [40] relataram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* apresentou um valor de emulsão de 53,7% e 50,2% para o óleo diesel e óleo de motor, respectivamente.

A composição do óleo de cozinha é alterada depois do uso para fritura. O processo de fritura altera a concentração de ácidos graxos poliinsaturados, aumentando os ácidos graxos saturados e monoinsaturados [41], com isso este óleo pode conter 30% de compostos polares, entretanto este valor pode mudar dependendo da variedade de alimentos, do tipo de fritura e do número de vezes em que este foi utilizado [42].

O índice de emulsificação para o óleo de fritura obtido a partir do *Bacillus* sp. no presente estudo foi semelhante ao mostrado por OLIVEIRA *et al.* [43] que ao utilizarem o mesmo substrato como fonte de carbono para *Bacillus pulimus*, produziram biossurfactante e obtiveram um índice de emulsificação que variou de 45% a 50%. Os autores adicionaram ao meio de sais minerais diferentes concentrações do óleo de fritura (1% a 5%). Comumente as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* são bastantes estudadas e relatadas como produtoras de diferentes tipos biossurfactante, sendo a surfactina o principal lipopeptídio sintetizado [13].

É notório que existe uma grande variabilidade em relação ao índice de emulsificação, pois o tipo de biossurfactante produzido bem como as diferentes fontes de carbono testadas podem alterar a estrutura dos biossurfactantes e com isso influenciarem nas propriedades emulsificantes [44]. Além disso, a emulsão de diferentes hidrocarbonetos ocorre de distintas formas [45]. Com base nesse contexto pode-se justificar o fato de uma mesma linhagem de *Bacillus* sp. ou *Lysinibacillus* sp. mostraram diferentes índices de emulsificação devido ao uso de diferentes óleos como fonte de carbono.

A concentração do substrato ou a adição de suplementos ao meio podem influenciar na atividade emulsificante do biossurfactante, esse fato foi relatado por KIM *et al.* [46] que mostraram que a atividade emulsificante do Emulsan pode ser modificada com a suplementação de ácidos graxos, atingindo uma maior atividade emulsificante (2,44 a 600 nm). O Emulsan é um biossurfactante polimérico e é sintetizado por *Acinetobacter calcoaceticus*, sendo reconhecido por sua capacidade em estabilizar emulsões do tipo óleo/água [47]. KITAMOTO *et al.* [48] utilizaram lipídios de monosileritritol produzido por *Pseudozyma (Candida antarctica)* a partir de óleos vegetais para produzir biossurfactante e obtiveram uma atividade emulsificante de 1,5 e 2,0 a 620 nm.

Embora a produção de biossurfactante seja comumente relatada como dependente do crescimento celular [42], no presente estudo não houve essa relação, pois, alguns fatores como a concentração do substrato, pH e a composição do meio de cultivo podem interferir de forma a inibir ou aumentar a concentração do biossurfactante e o crescimento celular [49].

A redução no pH foi observada em alguns substratos avaliados e tal fato possivelmente ocorreu devido à produção de metabólitos secundários pelas bactérias, que acidificam o meio durante o processo de fermentação [50]. O pH também pode ter influenciado na produção de biossurfactante, pois em pH ácido ou pH alcalino demais pode ocorrer um baixo nível de produção de biossurfactante [36].

5. CONCLUSÕES

Os isolados *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. foram capazes de produzir biossurfactantes a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. O óleo de soja foi o substrato que apresentou os melhores resultados. O biossurfactante produzido pode ser aplicado como agente emulsificante e surfactante. Este trabalho alinha-se ao esforço de prospecção de diversos resíduos e/ou subprodutos a serem utilizados como fonte de carbono, de baixo custo, na produção de moléculas de interesse biotecnológico.

6. AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental e ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis (PPGPur) da UFSCar.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] BANAT, I.M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., *et al.*, “Microbial biosurfactants production, applications and future potential”, *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 87, n. 2, pp. 427–444, Abr. 2010.
- [2] SANTOS, A.P.P., SILVA, M.D.S., COSTA, E.V.L., *et al.*, “Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 51, n. 2, pp. 1–10, Abr. 2018.
- [3] OTZEN, D.E. “Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins : same but different?”, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1859, n. 4, pp. 639-649, Abr. 2017.

- [4] ABALOS, A. PINAZO, A., INFANTE, M.R., *et al.*, “Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes”, *Langmuir*, v.17, n.5. pp. 1367–1371, Fev. 2001.
- [5] MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. “Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources”, *Institute of Microbiology Tecnology*, v. 2, n. 2, pp. 237-238, Abr. 1999.
- [6] GEYS, R., SOETAERT, W., VAN BOGAERT, I. “Biotechnological opportunities in biosurfactant production”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 30, pp. 66-72, Dez. 2014.
- [7] BAINDARA, P., MANDAL, S.M., CHAWLA, N., *et al.*, “Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample”, *AMB Express*, v. 3, n. 1, pp. 1-11, Jan. 2013
- [8] PARASZKIEWICZ, K., BERNAT, P., KUŚMIERSKA, A., *et al.*, “Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources”, *Journal of Environmental Management*, v. 209, pp. 65-70, Mar. 2018.
- [9] ZHAO, Z., WANG, Q., WANG, K., *et al.*, “Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components”, *Bioresource Technology*, v. 101, n. 1, pp. 292-297, Jan. 2010.
- [10] BÉCHET, M., CASTÉRA-GUY, J., GUEZ, J.S., *et al.*, “Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*”, *Bioresource Technology*, v. 145, n. 5, pp. 264-270, Out. 2013.
- [11] WEI, W.H., WANG, L.-C., CHEN, W.C., *et al.*, “Production and characterization of fengycin by indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 originating from a potato farm,” *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 11, pp. 4526-4538, Nov. 2010.
- [12] PATHAK, K., KEHARIA, H. “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 Biotechnology*, v. 4, n. 3, pp. 283-295, Jun. 2014.
- [13] WU, Y.-S., NGAI, S.-C., GOH, B.-H., *et al.*, “Anticancer activities of surfactin potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery”, *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, pp. 1-22, Out. 2017.
- [14] SANTOS, V. S. V., SILVEIRA, E., PEREIRA, B.B. “Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 21, pp. 382-399, Jan. 2019.
- [15] BHARDWAJ, G., CAMEOTRA, S.S., CHOPRA, H.K. “Biosurfactant from *Lysinibacillus chungkukjangi* from rice bran oil sludge and potential applications”, *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 19, n. 5, pp. 957-965, Set. 2016.
- [16] BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. “Potential commercial applications of microbial surfactants”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 5, pp. 495-508, Mai. 2000.
- [17] SINGH, A., VAN HAMME, J.D., WARD, O.P. “Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. application aspects”, *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 1, pp. 99-121, Jan.-Feb. 2007.
- [18] 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, n. 6, pp. 604-620, Nov.-Dez. 2006.
- [19] GAUR, V.K., BAJAJ, A., REGAR, R.K., *et al.*, “Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides”, *Bioresource Technology*, v. 272, pp. 19-25, Jan. 2019.
- [20] SOUSA, M., MELO, V.M.M., RODRIGUES, S. *et al.*, “Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, n. 6, pp. 897-906, Ago. 2012.
- [21] GARG, M., PRIYANKA, CHATTERJEE, M. “Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*”, *Biotechnology Reports*, v. 18, pp.e00251, Jun. 2018.
- [22] SEN, S., BORAH, S.N., BORA, A., *et al.*, “Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3”, *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, pp. 1-14, Mai. 2017.
- [23] SEKHON RANDHAWA, K., RAHMAN, P.K.S.M. “Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market”, *Frontiers in Microbiology*, v. 5, pp. 1-7, Set. 2014.

- [24] BEN AYED, H., JEMIL, N., MAALEJ, H., *et al.*, “Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, pp. 8-14, Abr. 2015.
- [25] GASPARIN, F.G.M., MAGRI, A., NEVES, A.F., *et al.*, “Produção de lipase e biosurfactante por isolado de efluente de laticínio”, *BBR - Biochemistry Biotechnology Reports*, v. 1, n. 1, pp. 28-31, 2012.
- [26] VAN SOOLINGEN, D., DE HASS, P.E.W., HERMANS, P.W.M., *et al.*, “Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*”, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 8, pp. 1987-1995, Ago. 1993.
- [27] NITSCHKE, M., FERRAZ, C., PASTORE, G.M. “Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes”, *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 1-2, pp. 81–85, Jun. 2004.
- [28] ABBASI, H., HAMED, M.M., LOTFABAD, T.B., *et al.*, “Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant,” *Journal of Bioscience Bioengineering*, v. 113, n. 2, pp. 211-219, Fev. 2012.
- [29] KIM, S.H., LIM, E.J., LEE, S.O. *et al.*, “Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417”, *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 31, n. 3, p. 249, Jun. 2000.
- [30] BICCA, F., COLOMBO FLECK, L., ZÁCHIA AYUB, M.A. “Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*”, *Revista de Microbiologia*, v. 30, pp. 231–236, Set. 1999.
- [31] YOUSSEF, N.H., DUNCAN, K.E., NAGLE, D.P., *et al.*, “Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms”, *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, n. 3, pp. 339-347, Mar. 2004.
- [32] DESAI, J.D., BANAT, I.M. “Microbial production of surfactants and their commercial potential”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 1, pp. 47-64, Mar. 1997.
- [33] SILVA, M.V.I. “Efeitos do uso do biodiesel sobre propriedades do óleo lubrificante usado em um motor de ignição por compressão”, Dissertação MSc., USP, São Carlos, SP, Brasil, 2006.
- [34] SILVEIRA, E.L.C., CALAND, L.B., MOURA, C.V.R., *et al.*, “Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes”, *Química Nova*, v. 29, n. 6, pp. 1193-1197, Nov.-Dez. 2006.
- [35] SADLER, W.R., TRUDINGER, P.A. “The inhibition of microorganisms by heavy metals”, *Mineralium Deposita*, v. 2, pp. 158-168, Nov. 1967.
- [36] THAVASI, R., SUBRAMANYAM NAMBARU, V.R.M., *et al.*, “Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources”, *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, pp. 30-36, Jan. 2011.
- [37] DECESARO, A., RIGON, M.R., THOMÉ, A., *et al.*, “Produção de biosurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel”, *Química Nova*, vol. 36, no. 7, pp. 947-954, 2013.
- [38] BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., *et al.*, “Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil”, *Microbiological Research*, v. 160, n. 3, pp. 249-255, 2005.
- [39] MNIF, S., CHAMKHA, M., LABAT, M., *et al.*, “Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 111, no. 3, pp. 525-536, Set. 2011.
- [40] SILVA, S.N.R.L., FARIAS, C.B.B., RUFINO, R.D., *et al.*, “Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, n. 1, pp. 174-183, Ago. 2010.
- [41] LOPES, M.R.V., AUED-PIMENTEL, S., CARUSO, M.S.F., *et al.* “Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura”, *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, n. 2, pp. 168-176, Jan. 2004.
- [42] KOCK, J.L.F., BOTHA, A., BLOCH, J., *et al.*, “Used cooking oil: science tackles a potential health hazard”, *South Africa Journal of Science*, v. 92, n. 11-12, pp. 513–514, Nov.-Dez.1996.
- [43] OLIVEIRA, J.G., GARCIA-CRUZ, C.H. “Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 56, n. 1, pp. 155-160, Jan.-Fev. 2013.

- [44] COOPER, D.G., GOLDENBERG, B.G. "Surface-active agents from two *Bacillus* species" *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, pp. 224-229, Fev. 1987.
- [45] ILORI, M.O., AMOBI, C.J., ODOCHA, A.C. "Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment", *Chemosphere*, v. 61, n. 7, pp. 985-992, Nov. 2005.
- [46] KIM, P., OH, D.K., LEE, J.K. KIM, S.Y., *et al.*, "Biological modification of the fatty acid group in an emulsan by supplementing fatty acids under conditions inhibiting fatty acid biosynthesis", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 3, pp. 308-312, 2000.
- [47] NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. "Biossurfactantes: propriedades e aplicações", *Química Nova*, v. 25, n. 5, pp. 772-776, 2002.
- [48] KITAMOTO, D., IKEGAMI, T., SUZUKI, G.T., *et al.*, "Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*", *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 20, pp. 1709-1714, Out. 2001.
- [49] TAN, Y.N., LI, Q. "Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources", *Microbial Cell Factories*, v. 17, n. 1, p. 89, Jun. 2018.
- [50] PINTO, M.H., MARTINS, R.G., COSTA, J.A.V. "Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos", *Química Nova*, v. 32, n. 8, pp. 2104-2108, 2009.

ORCID

Maria dos Remédios A. Vieira Neta	https://orcid.org/0000-0003-0788-1579
Gabriela Fiori da Silva	https://orcid.org/0000-0001-9803-1267
Pierre Ferreira do Prado	https://orcid.org/0000-0002-3718-8655
Mônica Aparecida de Almeida	https://orcid.org/0000-0002-0258-3882
Iolanda Cristina Silveira Duarte	https://orcid.org/0000-0002-9141-1010