



**MARCELA MAGALHÃES MELO**

**BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Bacillus* spp. FOR USE  
IN DAIRY INDUSTRY EFFLUENTS**

**LAVRAS – MG**

**2022**

**MARCELA MAGALHÃES MELO**

**BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Bacillus* spp. FOR USE IN DAIRY  
INDUSTRY EFFLUENTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora  
Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Co orientador  
Prof. Dr. Victor Satler Pylro

**LAVRAS – MG  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca

Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Melo, Marcela Magalhães.

Biosurfactant production by *Bacillus* spp. for use in dairy industry effluents / Marcela Magalhães Melo. - 2022.

69 p.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Coorientador(a): Victor Satler Pylro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Biosurfactants. 2. Soybean oil. 3. *Bacillus subtilis*. I. Silva e Batista, Cristina Ferreira. II. Pylro, Victor Satler. III. Título.

**MARCELA MAGALHÃES MELO**

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus* spp. PARA  
APLICAÇÃO EM EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

**BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Bacillus* spp. FOR USE IN  
DAIRY INDUSTRY EFFLUENTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA

Dr.<sup>a</sup> Luciana Silva Ribeiro - UFLA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cíntia Lacerda Ramos – UFVJM

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Nirlane da Costa Souza - UFVJM

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Dias Moreira - Centro Paulo Souza/FATEC Luigi Papaiz

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2022**

*A minha família, meu alicerce*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTO

À Deus.

À minha mãe, meus irmãos e meu pai, pelo amor, carinho, apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigada mãe por todas as orações, pelos conselhos e pelo amor incondicional.

Aos meus familiares pelo apoio e amor incondicional.

Ao André, por todo amor, paciência, incentivo, ajuda, por ser meu suporte, obrigada por sempre apoiar meus sonhos e sonhar comigo. À toda família do André, que se tornou minha família, obrigada por todo amor e acolhimento.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À FAPEMIG e ao CNPq.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos.

Aos funcionários do DBI, especialmente Rose, Cidinha, Ivani e Dirceu pelo auxílio, paciência e amizade.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com este trabalho.

À minha querida orientadora, Cristina Ferreira Silva e Batista, que foi um presente de Deus na minha vida, agradeço pelo incentivo, dedicação, suporte e orientação. Por todo carinho maternal que sempre me acolheu, obrigada por confiar no meu potencial, me guiar e caminhar comigo no desenvolvimento de todos trabalhos.

Ao meu coorientador professor Victor Satler Pylro pelo suporte e orientação.

A todos os amigos que conquistei durante todos esses anos na Micro, obrigada pela ajuda em todos os momentos, por tornarem o trabalho de pesquisa mais agradável e divertido.

À Mari Dias, que me apresentou o apaixonante mundo dos microrganismos, obrigada por todo o conhecimento compartilhado, apoio e principalmente pela amizade. Guardo com carinho todos os momentos que compartilhamos. Obrigada por ser essa pessoa tão maravilhosa que contagia a todos com seu carinho e sorriso.

Às minhas queridas amigas Kelly e Angel, obrigada pela amizade, com vocês vivi momentos super especiais, morro de saudades das nossas conversas infinitas e contemplações do pôr do sol na salinha.

Aos meus queridos amigos do NEMAI, que se tornaram uma família, obrigada por toda ajuda, paciência, convivência e momentos de descontração, em especial à Jéssica e a Lú, que se tornaram amigas super especiais em minha vida.

Obrigada a todos que, mesmo não citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa.

A todos vocês minha eterna gratidão!

Muito obrigada!

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas  
horas mais difíceis, se você se lembrar de acender a luz”*

*Dumbledore (J.K Rowling)*

*(Harry Potter e o prisioneiro de Azkaban)*



## RESUMO

Biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos pelo metabolismo secundário de diferentes grupos de microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Bactérias do gênero *Bacillus* são reconhecidos como bons produtores de biossurfactantes lipopeptídeos por produzirem compostos que apresentam como propriedades característica como; capacidade emulsificante, antimicrobiana, ação antibiótica, inibitória da formação de biofilmes e degradação de hidrocarbonetos, o que possibilita sua utilização em diferentes setores industriais e aplicações ambientais. Tendo em vista a necessidade de utilização de compostos ambientalmente amigáveis em estações de tratamento de efluentes gordurosos, a utilização de biossurfactantes microbianos é uma alternativa. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi produzir biossurfactante inoculando cepas de *Bacillus* ssp em óleo de soja usado como fonte de carbono e posteriormente sua aplicação em estações de tratamento de efluentes da indústria de laticínios. Foram selecionadas três bactérias do gênero *Bacillus*, identificadas como pertencentes as espécies *Bacillus subtilis* as cepas CCMA 0658 e CCMA 2031 e *Bacillus velezensis* a cepa CCMA 0087, utilizando o teste de colapso de gota e  $\beta$ -hemólise. As cepas produtoras de biossurfactante foram inoculadas em meio contendo óleo de soja usado como fonte de carbono. Para avaliação dos biossurfactantes produzidos, foram realizados os seguintes teste: (i) emulsificação (IE<sub>24</sub>), (ii) ensaios de espalhamento de óleo e (iii) análise da tensão superficial. Os biossurfactantes brutos produzidos pelas três cepas de *Bacillus* apresentaram propriedades emulsificantes e tensoativas. A emulsificação (IE<sub>24</sub>), foi igual ou superior a 40%, os valores de espalhamento de óleo foram superiores a 50% do diâmetro da placa de Petri e a tensão superficial inferior a 35 mN m<sup>-1</sup>, para todas as três cepas. Quando aplicado no efluente de laticínio os biossurfactantes produzidos pelas cepas *B. velezensis* CCMA 0087 e *B. subtilis* CCMA 2031 apresentaram valores de 25% no teste de emulsificação. Os resultados obtidos sugerem que em volumes adequados os biossurfactantes produzidos poderiam promover uma maior solubilidade das gorduras presentes nesses efluentes.

**Palavras-chaves:** Óleo de soja, biotecnologia ambiental, bactérias, tratamento de efluente, resíduos industriais, tratamento biológico.

## ABSTRACT

Biosurfactants are surface-active compounds produced by the secondary metabolism of different groups of microorganisms, such as bacteria, filamentous fungi and yeasts. Bacteria of the genus *Bacillus* are recognized as good producers of lipopeptide biosurfactants for producing compounds that have characteristic properties such as; emulsifying, antimicrobial, antibiotic action, inhibition of biofilm formation and hydrocarbon degradation, which allows its use in different industrial sectors and environmental applications. Considering the need to use environmentally friendly compounds in fatty effluent treatment plants, the use of microbial biosurfactants is an alternative. Thus, the objective of the present work was to produce biosurfactant by inoculating strains of *Bacillus* spp in soybean oil used as a carbon source and subsequently applying it to effluent treatment plants in the dairy industry. Three bacteria of the genus *Bacillus*, identified as belonging to the species *Bacillus subtilis* strains CCMA 0658 and CCMA 2031 and *Bacillus velezensis* strain CCMA 0087, were selected using the droplet collapse test and  $\beta$ -hemolysis. The biosurfactant-producing strains were inoculated in a medium containing soybean oil used as a carbon source. To evaluate the biosurfactants produced, the following tests were performed: (i) emulsification (IE<sub>24</sub>), (ii) oil scattering tests and (iii) surface tension analysis. The crude biosurfactants produced by the three strains of *Bacillus* showed emulsifying and surface-active properties. Emulsification (IE<sub>24</sub>) was equal to or greater than 40%, oil scattering values were greater than 50% of the Petri dish diameter and surface tension less than 35 mN m<sup>-1</sup> for all three strains. When applied to the dairy effluent, the biosurfactants produced by the strains *B. velezensis* CCMA 0087 and *B. subtilis* CCMA 2031 presented values of 25% in the emulsification test. The results obtained suggest that, in adequate volumes, the biosurfactants produced could promote greater solubility of the fats present in these effluents.

**Keywords:** Soybean oil, environmental biotechnology, bacteria, effluent treatment, industrial waste, biological treatment.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Funções dos biossurfactantes produzidos e aplicações.....	20
Tabela 2. Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.....	21
Tabela 3. Cepas de <i>B. subtilis</i> cultivadas em diferentes substratos para a produção de surfactina e seu rendimento final em gL <sup>-1</sup> .....	30
Tabela 4. Aplicação ambiental e industrial de surfactina produzida por cepas de <i>B. subtilis</i> e seus mecanismos de ação.....	30
Table 1. Strains <i>Bacillus</i> spp. belonging to the Agricultural Microbiology Culture Collection of the Department of Biology at UFLA-CCMA and their respective isolation origins in Brazil.....	48
Table 2. <i>Primers</i> used to trace the biosynthesis of lipopeptide biosurfactant (LPs) (PLAZA et al., 2015) .....	50
Table 3. Selection of potential biosurfactant-producing strains through the test to detect hemolytic activity.....	56
Table 4. Dry biomass (gL <sup>-1</sup> ) obtained from cultures of three strains of <i>Bacillus</i> in medium containing soybean oil used for biosurfactant production.....	58
Table 5. Emulsification Index values in soybean oil and biodiesel of biosurfactants produced by <i>Bacillus</i> strains cultivated in two types of fermentation.....	59
Table 6. Surface tension values determined for biosurfactants produced in Fermentation With Stirring (FWS) and Fermentation Without Agitation (FWA) using strains of <i>Bacillus</i> .....	62
Table 7. Relative root germination (RG%), root length (RL%) and germination index (GI%) obtained in the analysis of subchronic toxicity with onion seeds ( <i>Allium cepa</i> ) in samples of in natura dairy effluent, dairy effluent with sodium oleate, biosurfactants produced by strains of	

*Bacillus velezensis* CCMA 0087 and CCMA 0658 and *Bacillus subtilis* at concentrations of 5 and 2.5 mL..... 63

## LISTA DE ABREVIATURAS

*B. subtilis* – *Bacillus subtilis*

*B. velezensis* – *Bacillus velezensis*

C/N – Carbono/Nitrogênio

CMC – Concentração micelar crítica

CCMA – Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola

CONAMA – Conama Conselho Nacional do Meio Ambiente

DQO – Demanda química de oxigênio

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O – Sulfato de ferro

FWS – Fermentation With Stirring

FWA – Fermentation Without Agitation

GI – Índice de germinação

IE<sub>24</sub> – Índice de emulsificação

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato monopotássico

NaCl – Cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato dissódico

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de amônio

mN/m – Milinewton metro

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O – Sulfato de magnésio

MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O – Sulfato de manganês

pH – Potencial Hidrogeniônico

RG – Germinação relativa das raízes

RL – Comprimento da raiz

SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

## SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	16
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Surfactantes.....	18
2.2	Biossurfactantes.....	20
2.2.1	Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.....	21
2.3	Produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
2.4	Produção de biossurfactantes por <i>Bacillus velezensis</i> .....	31
2.5	Biorremediação.....	31
2.6	Óleo de soja.....	33
2.7	Rejeitos da indústria de laticínios.....	34
	REFERÊNCIAS.....	38
	SEGUNDA PARTE.....	45
1	INTRODUCTION.....	47
2	MATERIAL AND METHODS.....	48
2.1	Selection of strains producing biosurfactants.....	48
2.1.2	Genetic characterization of surfactin, fengycin and iturin genes.....	49
2.2	Identification of <i>Bacillus</i> strains.....	50
2.3	Biosurfactant production by <i>Bacillus</i> .....	51
2.4	Biomass production.....	52
2.5	Biosurfactant recovery.....	52
2.6	Evaluation of the biosurfactant produced.....	52
2.6.1	Measurement of surface tension.....	52
2.6.2	Oil spreading test.....	52
2.6.3	Emulsification index (IE).....	53
2.7	Treatment of effluent from the dairy industry.....	53

2.7.1	Biosurfactant and surfactant saponification.....	53
2.7.2	Application in dairy effluent.....	54
2.7.3	Emulsification Index.....	54
2.7.4	Subchronic Toxicity Analysis.....	54
2.8	Statistical analysis.....	55
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	55
3.1	Selection of <i>Bacillus</i> strains producing biosurfactants.....	56
3.2	Identification of <i>Bacillus</i> strains.....	57
3.3	Biosurfactant production.....	57
3.4	Biomass production.....	58
3.5	Evaluation of the biosurfactant produced.....	59
3.5.1	Superficial tension.....	61
3.6	Application in dairy effluent.....	62
3.6.1	Subchronic toxicity.....	63
4	CONCLUSIONS.....	64
5	REFERENCES.....	64

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são metabólitos secundários que possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial e aumentar a atividade emulsificante de um líquido, além de apresentar propriedades antimicrobianas. Podem ser produzidos por alguns microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Por serem de origem microbiológica esses apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos como biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e possibilidade de serem produzidos a partir da utilização de matérias-primas renováveis e de baixo custo (SINGH; PATIL; RALE, 2019). Estas características conferem a estes compostos uma ampla aplicabilidade como, por exemplo, em processos de biorremediação, em áreas contaminadas com hidrocarbonetos, na recuperação de petróleo, como agentes antimicrobianos na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos (GAUR et al., 2019).

Dentre os inúmeros biossurfactantes existentes, destacam-se os da classe dos lipopeptídeos, produzidos principalmente pelo gênero *Bacillus* (GHOJAVAND et al., 2008; SANTOS et al., 2016). As bactérias desse grupo são capazes de produzir amplo espectro de compostos surfactantes como, por exemplo, surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina. (GOMES et al., 2018). Esses biossurfactantes podem apresentar como propriedades alto poder tensoativo, atividade antimicrobiana e antibiótica

Dessa forma, uma das possíveis aplicações do biossurfactante é em estações de tratamento de efluentes, como os gerados na indústria de laticínios. Esse é um setor que gera uma grande quantidade de produtos e derivados do leite e, portanto, tem importância na economia brasileira e mundial (EMBRAPA, 2019).

A grande produtividade nas indústrias de laticínio leva também à produção de maior volume de resíduos líquidos (YONAR; SIVRIOĞLU; ÖZENGİN, 2018) compostos por leite, derivados diluídos e material sólido, principalmente substâncias graxas, detergentes e desinfetantes usados nas operações de limpeza, lubrificantes de máquinas e esgoto doméstico (USMANI et al., 2022).

Esse tipo de resíduo é problema pela presença de altos teores de gorduras, sólidos suspensos e matéria orgânica, o que dificulta a etapa de tratamento secundário do efluente, que ocorre em reatores anaeróbios ou aeróbios (USMANI et al., 2022; YONAR;



SIVRIOĞLU; ÖZENGIN, 2018). A aplicação do biossurfactante no tratamento primário do efluente auxiliaria na quebra de gorduras causando um aumentando na eficiência da etapa posterior.

Embora existam muitas vantagens e potencial aplicação dos biossurfactantes, o custo de produção desses ainda é alto. Estima-se que o a fonte de carbono utilizada representar cerca de 50% do custo total do processo de produção (JIMOH; LIN, 2019). Uma possibilidade para a redução desses custos é o uso de substratos alternativos baratos como fonte de carbono como resíduos agroindustriais ou domésticos.

Entre os substratos alternativos, o óleo de soja, utilizado em frituras nos domicílios ou em lanchonetes e restaurantes é gerado em grandes quantidades, já que o consumo de frituras é muito difundido e utilizado por toda população mundial. Com isso há a geração de milhões de litros de óleo de soja de uso doméstico por ano, cuja pequena porção é reutilizada para produção de sabão, detergente, biodiesel e massa de vidraceiro (SANTOS et al., 2013).

Portanto, grande parte do volume produzido é descartado de forma incorreta no ambiente, causando a contaminação do solo, do lençol freático e impedindo a entrada de luz e oxigênio em rios e lagos (SILVA et al., 2012).

Alguns estudos relatam o uso do óleo de soja usado em bioprocessos, como fonte de carbono ou como indutor para produção de compostos de interesse como, por exemplo, enzimas, biodiesel e biossurfactates (REINEHR et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi produzir biossurfactantes por cepas de *Bacillus* utilizando óleo de soja usado como indutor, com a possibilidade de constituir uma alternativa para serem aplicados em estações de tratamento de efluentes de laticínios, com o intuito de tornar o processo de tratamento ambientalmente amigável, promover uma forma de reutilização do óleo e diminuir os custos de produção.

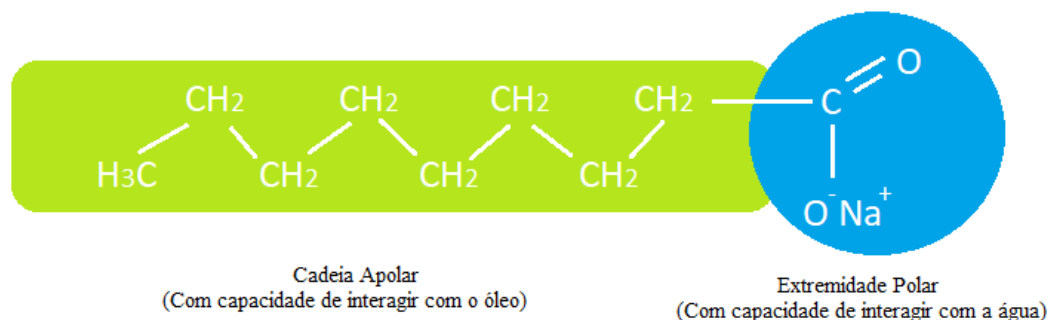
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Surfactantes

Os surfactantes representam uma importante classe de compostos químicos com amplas aplicações domésticas e em diferentes setores industriais (SATHI REDDY et al., 2016). São moléculas anfipáticas, de superfície ativa, constituídas por duas porções, hidrofóbica e hidrofílica, o que favorece a separação na interface entre fluidos com diferentes graus de polaridade tais como óleo/água e ar/água (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012).

A porção apolar hidrofóbica (solúvel em óleo) tem origem em uma cadeia carbônica (linear, ramificada ou com partes cíclicas) frequentemente representada por uma cadeia de hidrocarbonetos saturados e insaturados. A porção polar ou hidrofílica (solúvel em água) pode ser iônica (aniônicas ou catiônica), não iônica ou anfotérica, que pode ser formada por carboidratos, aminoácidos peptídeos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou álcoois (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012; MULLIGAN, 2005; SILVA et al., 2015), figura 1.

**Figura 1.** Estrutura esquemática de uma molécula de um surfactante, com suas extremidades polar e apolar.

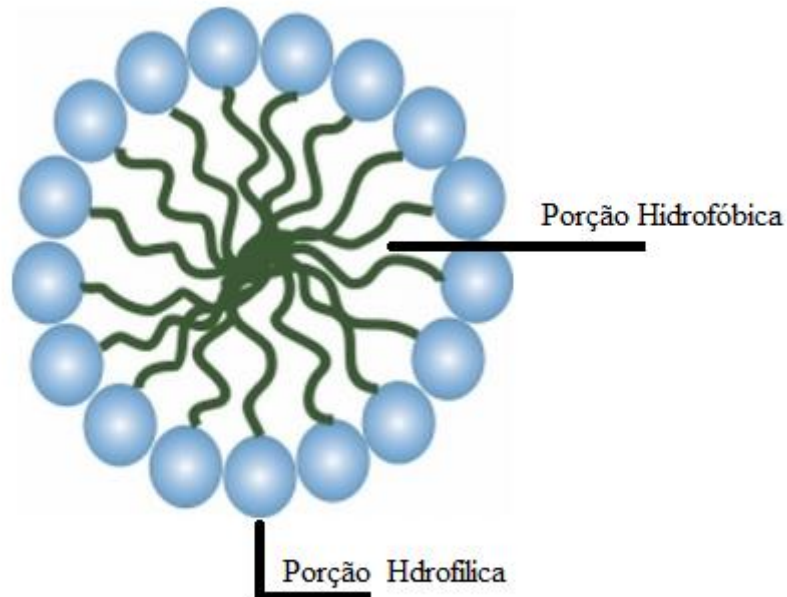


Fonte  
:  
Autor  
ia  
própria (2022).

Os surfactantes têm como importante característica a diminuição da tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas de um fluido. A tensão superficial reduz quando a concentração de surfactante no meio aumenta, ocorrendo a formação de micelas,

que são moléculas anfipáticas agregadas com porções hidrofílicas posicionadas na parte externa da molécula e porções hidrofóbicas na parte interna (Figura 2) (SATHI REDDY et al., 2016).

**Figura 2.** Estrutura esquemática de uma micela, destacando a porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica.



Fonte: (TIELEMAN; VAN DER SPOEL; BERENDSEN, 2000) adaptado.

Devido a essas características, os surfactantes podem ser aplicados em uma ampla gama de setores industriais, por possuírem ações como: lubrificação, capacidade molhante e espumante, dispersão de fases e solubilização (BORAH et al., 2015; SATHI REDDY et al., 2016). As aplicações dos surfactantes estão diretamente relacionadas com as propriedades físico-químicas do composto de ação (SILVA et al., 2015).

Muitos surfactantes são derivados do petróleo ou são quimicamente sintetizados com características que os tornam nocivos ao meio ambiente, como baixa biodegradabilidade, toxicidade elevada, bioacumulação, bem como eutrofização de corpos d'água, entre outros (GOMES et al., 2018; SILVA et al., 2015). Tendo em vista os problemas ambientais causados por esse composto sintético, tem-se uma preocupação em realizarem-se estudos de bioprocessos para produção de surfactantes de origem biológica denominados biosurfactantes.

## 2.2 Biossurfactante

Os biossurfactantes foram descobertos no ano de 1960, sendo nesta época caracterizados como compostos extracelulares anfílicos produzidos em estudos de fermentação utilizando hidrocarbonetos (SATHI REDDY et al., 2016). Esses, como os surfactante sintéticos, também possuem característica anfipática, sendo um grupo com diversos compostos químicos de superfície ativa produzidos espontaneamente por microrganismos, extracelularmente ou como parte da membrana celular (GAUR et al., 2019; GUDIÑA et al., 2013). A produção ocorre para auxiliar no transporte e translocação de substratos insolúveis como, por exemplo, hidrocarbonetos através da membrana celular durante o crescimento da célula (GOMES et al., 2018).

Os Biossurfactantes possuem características com ação detergente, emulsificante e poder surfactante, causando a diminuição da tensão superficial da água e outros solventes (GUDIÑA et al., 2013; SINGH; PATIL; RALE, 2019). Esses compostos são metabólitos sintetizados por uma grande variedade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, produzidos principalmente durante o crescimento aeróbio em meio de cultivo contendo carboidrato, hidrocarbonetos, óleos ou gorduras (SUDHANSHU SHEKHAR, 2015). O tipo de microrganismos e substrato utilizado durante o processo de fermentação irá definir o metabólito produzido (GOMES et al., 2018; SANTOS et al., 2016).

Uma das vantagens da utilização de microrganismos para produção destes compostos vantagem é o fato de poderem ser sintetizados através da fermentação utilizando fontes renováveis e com alta diversidade química, permitindo aplicações específicas em diferentes setores industriais bem como para tratamento de poluentes orgânicos, recuperação de petróleo e processos de biorremediação em áreas contaminadas com hidrocarbonetos (DRAKONTIS; AMIN, 2020; GUDIÑA et al., 2013) (tabela 1).

**Tabela 1.** Funções dos biossurfactantes produzidos e aplicações.

<b>Função do Biossurfactante</b>	<b>Aplicação</b>
Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química em geral

Solubilização	Alimentícia, cosmética, farmacêutica, papel, plásticos e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, petrolífera, plásticos, curtumes, biorremediação e têxtil
Detergente e formadores de espuma	Curtumes, produtos para agricultura, indústria química, metalúrgica e mineração
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizantes	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação, tratamento de resíduos e mineração
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia e cascalho	Construção civil

Fonte: (DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Além das características mencionadas, os biossurfactantes apresentam maior estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, o que constitui vantagens adicionais sobre os correlatos de origem sintética (SHARMA; SINGH; VERMA, 2018).

Estudos aperfeiçoaram o processo de produção de biossurfactantes, alterando as variáveis que influenciam o tipo e quantidade do composto produzido (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007). Variáveis importantes neste processo são as fontes de carbono e nitrogênio e parâmetros físicos e químicos como, por exemplo, oxigênio, temperatura e pH (SUDHANSHU SHEKHAR, 2015).

### 2.2.1 Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores

A diversidade das estruturas químicas dos biossurfactantes está diretamente relacionada com a variedade de microrganismos produtores desses metabólitos (MARCHANT; BANAT, 2012). Dessa forma, o tipo, quantidade e pureza do biossurfactante variam de acordo com o microrganismo escolhido, substrato utilizado, concentração de

nutrientes como nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio, além de temperatura, pH e aeração (GOMES et al., 2018).

Os biossurfactantes, de modo geral, podem ser classificados em glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídios e ácidos graxos/lipídio neutro, além de surfactantes poliméricos ou lipossacarídeos e surfactantes particulados (SATHI REDDY et al., 2016) (tabela 2).

**Tabela 2.** Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores

<b>Classe de Biossurfactante</b>	<b>Tipo de Biossurfactante</b>	<b>Microrganismos</b>
<b>Glicolipídios</b>	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida lombicola</i>
	Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e Lipoproteínas</b>	Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Candida lepus</i>
<b>Ácidos Graxos, Lipídios Neutros e Fosfolipídios</b>	Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídios	<i>Thiobacillus tiooxidans</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<b>Surfactantes</b>	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>



características cepa-dependentes e variam de 3,0 a 10,0 e a temperatura de 15 a 35 ° C (TEIXEIRA SOUZA et al., 2018).

A fonte de carbono é um fator crucial para a produção de ramnolipídeos e incluem alcanos, piruvato, frutose, glicerol succinato, manitol, óleo de oliva, óleo vegetal e glicose (MONDAL et al., 2017). Em relação à fonte de nitrogênio pode ser utilizado farelo de soja, extrato de levedura, polipeptona, extrato de carne e extrato de malte para o crescimento microbiano (TEIXEIRA SOUZA et al., 2018). Porém a síntese de ramnolipídios tem sido associada à exaustão da fonte de nitrogênio e início da fase estacionária de crescimento (BENINCASA et al., 2002). A relação C/N é outro fator importante na condição de cultivo para produção, pois influencia diretamente a produção de biomassa e de ramnolipídeos, sendo estabelecidas para máxima produção razões de C/N entre 16 e 18 (SANTOS et al., 2013).

Os ramnolipídeos podem ser utilizados, além das propriedades surfactantes, como agentes de quelação e remoção de metais pesados como, por exemplo, cádmio e zinco (MARCHANT; BANAT, 2012).

Semelhantemente, para produção de soforolipídios utilizam-se óleos vegetais, alcanos e ácido oleico como substratos. Neste caso a produção ocorre especialmente por leveduras dos gêneros *Torulopsis bombicola*, *Candida apicola*, *Candida lipolytica*, *Candida lombicola*, *Pseudozyma rugosa* e *Rhodotorula bogoriensis*. Além das propriedades tensoativas, os soforolipídeos apresentam potencial antimicrobiano e anticancerígeno (GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; BHATTACHAJEE, 1968).

Os trealolipídeos são formados pela ligação do dissacarídeo trealose a duas moléculas de ácido-hidroxicarboxílico de cadeia longa e ramificada (GOMES et al., 2018). *Rhodococcus erythropolis* e *Mycobacterium* sp. são os microrganismos mais conhecidos como produtores deste composto (BARROS et al., 2007).

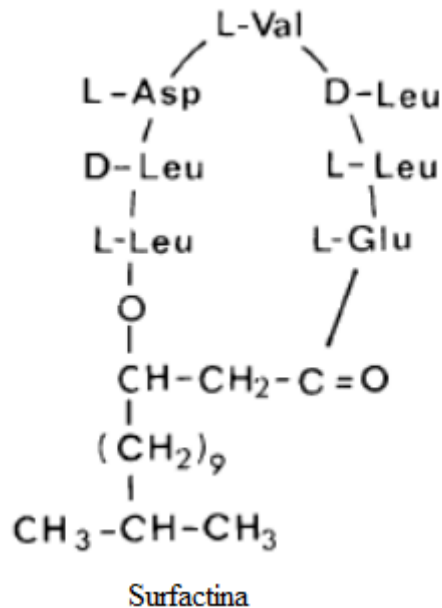
Lipopeptídeos e Lipoproteínas são as classes de biossurfactantes formadas por peptídeos cíclicos de ocorrência natural que contém uma única cadeia de ácido graxo. São os grupos de biossurfactantes mais descritos devido a eficiência como tensoativos bem como atividade antimicrobiana e antibiótica (WEI; LAI; CHANG, 2007).

O lipopeptídeo mais conhecido é a surfactina, um dos mais eficientes biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. Este grupo apresenta capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com concentração menor que 0,005% do biossurfactante (BARROS et al., 2007; DE ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013). Além disso, a surfactina apresenta outras vantagens sobre os surfactantes sintéticos como, por exemplo, biodegradabilidade e baixa concentração micelar crítica (CMC), ou seja, é necessária uma



menor concentração de biossurfactante para alcançar os menores índices de tensão superficial do solvente (MULLIGAN, 2005).

**Figura 4.** Ilustração da estrutura química do lipopeptídeo surfactina.



Fonte: (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Diferentes parâmetros podem influenciar na produção da surfactina. A adição de nutrientes específicos como  $\text{FeSO}_4$  causam efeitos positivos diretos, porém interferem na produção de biomassa (WEI; LAI; CHANG, 2007). A fonte de carbono é outro fator limitante para a produção do biossurfactante. Desta forma, ao escolher o substrato, deve-se levar em consideração o custo e a disponibilidade, bem como as necessidades nutricionais dos microrganismos e a aplicação do biossurfactante produzido (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2009; LIU et al., 2010).

Temperatura, pH e oxigênio dissolvido no meio são outros parâmetros que influenciam significativamente a produção de surfactina por *B. subtilis*. Durante o cultivo, o pH deve permanecer entre 6,0 e 9,0, sendo o ideal de produção por *B. subtilis* pH na faixa de 6,75 (YEH; WEI; CHANG, 2005). A disponibilidade de oxigênio dissolvido é outro aspecto que afeta a produção de surfactina por *B. subtilis*. Estudos mostraram que o aumento da concentração de oxigênio dissolvido por agitação rápida, entre 200 a 250 rpm, influenciou

positivamente a produção de surfactina por essas bactérias (GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011; YEH; WEI; CHANG, 2005).

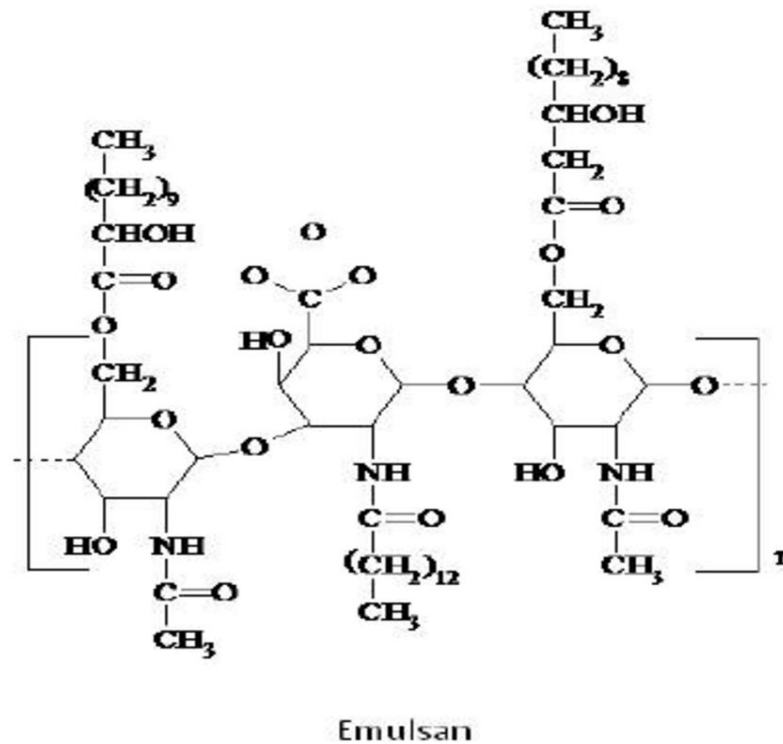
Outros parâmetros de cultivo podem influenciar na produção de surfactina como, por exemplo, o tamanho do inóculo e o estado fisiológico das células (células vegetativas ou esporos) (GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

Ácidos graxos e fosfolípidios representam uma classe de biossurfactantes que podem ser produzidos durante o crescimento de diferentes cepas de bactérias e leveduras utilizando-se de n-alcenos como fonte de carbono e energia (MUTHUSAMY et al., 2008). O tamanho da cadeia de hidrocarbonetos determina a composição hidrofílica e lipofílica dos ácidos graxos (SUDHANSHU SHEKHAR, 2015).

Lípídeos neutros são biossurfactantes desta classe, sintetizados por espécies de *Mycobacterium* spp. e por algumas espécies dos gêneros *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus*, sendo o tipo de surfactante produzido determinado pelas condições de cultivo, bem como a fonte de carbono utilizada (SUDHANSHU SHEKHAR, 2015).

Surfactantes poliméricos é uma classe que apresenta alta afinidade por interfaces óleo/água, possibilitando assim a formação de emulsões mais estáveis. Os surfactantes mais bem estudados são: emulsan, liposane e mannoпротеína. (NITSCHKE; PASTORE, 2006). A bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* produz o bioemulsificante emulsan extracelularmente. Esse foi o primeiro biossurfactante a ser produzido e comercializado em larga escala (figura 5) (GOMES et al., 2018). O liposane é produzido por cepas de *Candida lipolytica* e a mannoпротеína por espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo essa considerada como uma proteína com excelente atividade emulsificante em vários óleos, solventes orgânicos e alcanos, sendo produzido através de processos biotecnológicos de baixo custo, por utilizar como fonte de carbono resíduos agroindustriais (SUDHANSHU SHEKHAR, 2015).

**Figura 5.** Ilustração da estrutura química do surfactante polimérico emulsan.



Fonte: (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Surfactantes particulados representa uma classe de células e vesículas microbianas com atividade tensoativa. Algumas células microbianas apresentam hidrofobicidade superficial, fazendo com que sejam consideradas biossurfactantes por apresentarem essa característica (GAUTAM; TYAGI, 2006). Essas células estão envolvidas na captação de alcanos para a célula do microrganismo, possuindo atividade surfactante (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Uma ampla variedade de microrganismos apresenta capacidade de produzir numerosos tipos de biossurfactantes, e esses possuem diferentes aplicações, desde ambientais e industriais, até domésticas. Porém, os processos e mecanismos de produção desses ainda não foram totalmente elucidados (GOMES et al., 2018).

### 2.3 Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*

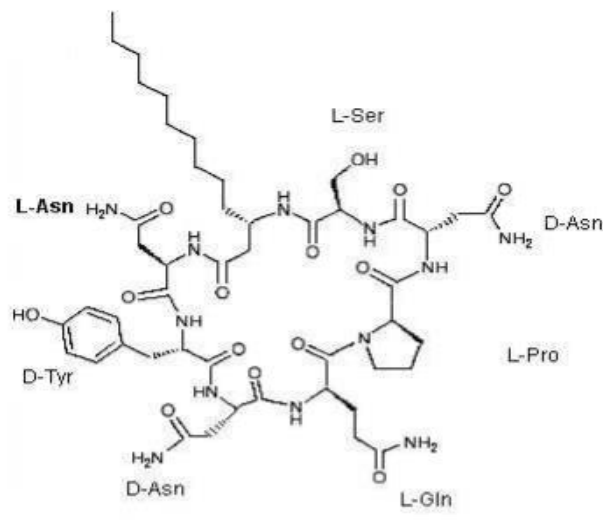
Dentre as diversas espécies microbianas produtoras de biossurfactantes destaca-se *B. subtilis* (GONÇALVES et al., 2015). Essas bactérias ocorrem naturalmente no solo, em fontes de água, ou associadas a plantas. *Bacillus subtilis* apresenta também potencial para produção de enzimas e antibióticos, sendo utilizados em diversos processos biotecnológicos para produção desses (LIU et al., 2015).

Os biosurfactantes produzidos *B. subtilis* podem apresentar ação antibiótica, uma vez que a surfactina possui atividade antibiótica potente por apresentar estrutura química anfipática, o que leva a acreditar que essa atua desestabilizando a integridade da bicamada lipídica. A surfactina pode apresentar também ação antiviral e de inibição da formação de coágulos (LIU et al., 2015; TENDULKAR et al., 2007).

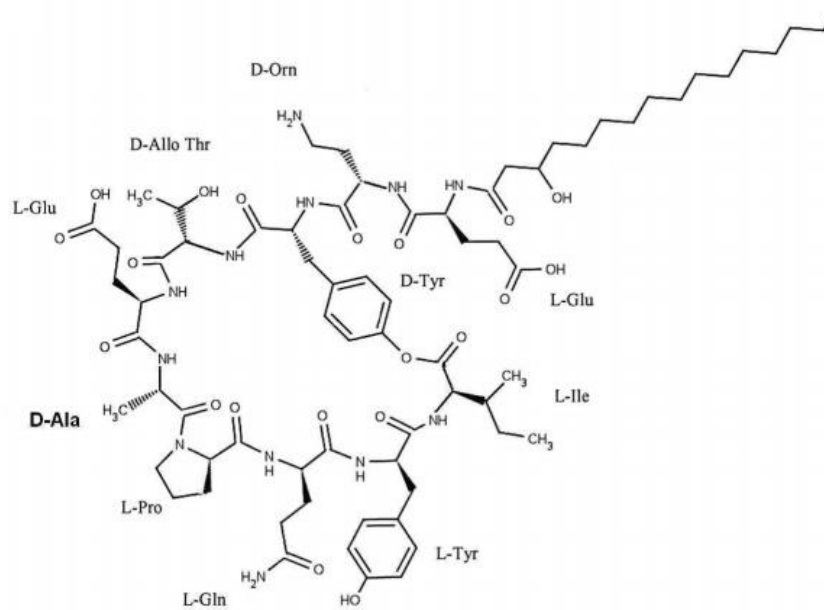
Bactérias desse gênero são consideradas potenciais fontes para a produção de biosurfactantes devido a sua não patogenicidade, que permite o uso em diferentes setores industriais bem como aplicações ambientais. *Bacillus* spp. produzem uma variedade de surfactantes da classe dos lipopeptídeos cíclicos, como as iturinas, surfactina e fengicinas (figura 6) (MULLIGAN, 2005).

**Figura 6.** Ilustração da estrutura química dos surfactantes lipopeptídeos cíclicos: a) Iturinas e b) Fengicinas.

a)



b)



Fonte: (VATER et al., 2002).

Biossurfactantes podem ser produzidos por cepas de *B. subtilis* utilizando como fonte de carbono substratos que contenham açúcares, óleos vegetais ou amido (DE CASTRO et al., 2015). Porém, a produção desses biossurfactantes apresenta alto custo, bem como sua recuperação é cara, sendo esses os principais fatores negativos que limitam sua produção (GOMES et al., 2018). Desta maneira, uma alternativa é utilizar recursos sustentáveis e de baixo custo, especialmente os subprodutos industriais e agroindustriais de baixo valor agregado (GOMES et al., 2018; SATHI REDDY et al., 2016).

O tipo de lipopeptídeo produzido e a quantidade dependem da composição da matéria prima utilizada. Nitschke et al. (2013), utilizando cepas de *Bacillus subtilis* em águas residuárias de mandioca, produziram  $3,0 \text{ gL}^{-1}$  de surfactina. (VEDARAMAN; VENKATESH, 2011) Vedaraman *et al.* (2011) produziram  $0,983 \text{ gL}^{-1}$  de surfactina a partir de óleo de fritura. Em estudo utilizando melão como fonte de carbono, Abdel-Mawgoud et al. (2008) observaram maior produção de surfactina em comparação à fermentação utilizando glicose. Outro substrato que tem sido utilizado para a produção de biossurfactante é o glicerol bruto, sendo observado valores de produção entre  $0,44$  e  $0,27 \text{ gL}^{-1}$ , obtidos das linhagens de *B. subtilis* LAMI 005 e LAMI 009, respectivamente (DE FARIA et al., 2011; GOMES et al., 2018). A tabela 3 apresenta diferentes cepas de *B. subtilis* cultivadas em distintos substratos para a produção de surfactina.

**Tabela 3.** Cepas de *B. subtilis* cultivadas em diferentes substratos para a produção de surfactina e seu rendimento final em gL<sup>-1</sup>.

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produção de Surfactina (gL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Hidrolisado de celulose do sisal	1,00 gL <sup>-1</sup>	MARIN et al., 2015
<i>B. subtilis</i> SPB1	Azeite de oliva	1,00 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Óleo de girassol	1,10 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Óleo de milho	1,10 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Parafina	1,30 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Querosene	1,74 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Óleo diesel	1,50 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Benzeno	1,00 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> SPB1	Heptano	1,20 gL <sup>-1</sup>	GHRIBI et al., 2011
<i>B. subtilis</i> #573	Milhocina	1,30 gL <sup>-1</sup>	GUDIÑA et al., 2015
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Milhocina	0,158 gL <sup>-1</sup>	GUDIÑA et al., 2015
<i>B. subtilis</i> LSFM-05	Milhocina	0,23 gL <sup>-1</sup>	GUDIÑA et al., 2015
<i>B. subtilis</i> LAMI 005	Glicerol	0,441 gL <sup>-1</sup>	SOUSA et al., 2014
<i>B. subtilis</i> LAMI 009	Glicerol	0,267 gL <sup>-1</sup>	DE FARIA et al., 2011
<i>B. subtilis</i> MTCC 2423	Resíduos de óleo de fritura	0,983 gL <sup>-1</sup>	VEDARAMAN et al., 2011

A surfactina produzida por *B. subtilis* apresenta diferentes mecanismos de atuação de acordo com suas propriedades físico-químicas, e esta característica confere a este composto aplicações em diferentes áreas, como pode ser observado na tabela 4.

**Tabela 4.** Aplicação ambiental e industrial de surfactina produzida por cepas de *B. subtilis* e seus mecanismos de ação.

<b>Atividade</b>	<b>Mecanismos</b>
<b>Aplicação Ambiental</b>	
Biorremediação	Atividades de superfície e emulsificantes

Biodegradação de hidrocarbonetos	Acelera degradação do hidrocarboneto
Biocontrole	Atividade bactericida
<b>Aplicações industriais</b>	
Antimicoplásmatica, antiviral e antibacteriana	Induz a formação de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica
Anti-inflamatória	Inibição da fosfolipase citosólica plaquetária
Antiadesiva	Inibição da formação de biofilme

Fonte: (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Dessa forma, bactérias do gênero *Bacillus* mostram-se eficientes para a produção de biossurfactantes com alta eficiência e menores custos de produção utilizando como fonte de carbono resíduos de baixo custo.

#### 2.4 Produção de biossurfactantes por *Bacillus velezensis*

*Bacillus velezensis* é uma espécie de bactéria gram-positiva, formadora de endósporos, essa como algumas outras espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* podem produzir como metabólitos secundários biossurfactantes. A espécie *B. velezensis* tem sido amplamente estudada por apresentar potencial como bactérias promotoras de crescimento e biocontrole de plantas, além da produção de biossurfactantes com propriedades antifúngicas que auxiliam na proteção da planta (WANG et al., 2020).

Estudos apontam que essas bactérias podem beneficiar o crescimento das plantas secretando metabólitos secundários que aumentam a eficiência na absorção de nutrientes, protegendo a planta de patógenos com a produção de antibióticos lipopeptídicos, antifúngicos e com a formação de biofilmes na rizosfera (RABBEE et al., 2019; WANG et al., 2020). Devido a essas características, biossurfactantes produzidos por bactérias da espécie *B. velezensis* apresentam ampla variedade de aplicações no setor agroindustrial.

#### 2.5 Biorremediação

O acúmulo de compostos poluentes orgânicos e inorgânicos tóxicos no solo e na água causam graves problemas ambientais. Uma alternativa para amenizar esta situação é a aplicação de técnicas de biorremediação, que é definida como o uso de processos biológicos

para degradar, transformar ou remover contaminantes de uma matriz ambiental como, por exemplo, água ou solo (SEN; DASTIDAR, 2011).

São empregadas diferentes técnicas para a biorremediação de ambientes contaminados. A escolha do processo utilizado dependerá da complexidade do ambiente e do contaminante, assim como a sua concentração (SEN; DASTIDAR, 2011). As técnicas podem ser aplicadas no local da contaminação (*in situ*) ou fora deste (*ex situ*), e estas podem ocorrer envolvendo diferentes processos como: bioaugmentação (introdução de microrganismos especializados na degradação do poluente), bioestimulação (introdução de substâncias que estimulam o crescimento microbiano), “landfarming” (biorremediação em uma camada superior do solo), fitorremediação (estimula-se o crescimento e atividade dos microrganismos ao se adicionar plantas no local, utilizado em locais contaminados com metais pesados), bioventilação (injeção de ar ou oxigênio puro em solos e água subterrânea contaminados) e compostagem (YU et al., 2018).

A eficiência dos processos de biorremediação irá depender de fatores físicos, químicos e biológicos como, por exemplo, biomassa microbiana, tempo de exposição, atividades enzimáticas, diversidade do substrato e fatores ambientais, influenciando diretamente a utilização dos poluentes pelos microrganismos (KRISTENSEN et al., 2010).

Em processos de biorremediação pode-se fazer uso de biossurfactantes em águas residuais para remoção de metais pesados. Para esse processo é utilizada a técnica de flotação, com objetivo de recuperar os minérios que se encontram aderidos ao resíduo (FAZAELIPOOR; KHOSHDAST; RANJBAR, 2010; GUO et al., 2017; SARUBBO et al., 2015; SUN et al., 2019). O biossurfactante promove a formação de uma espuma que possibilita que esses minerais sejam carregados para a superfície do líquido, uma vez que este promove a alteração da superfície dos metais, tornando-os hidrofóbicos (DELL’ANNO et al., 2018; RUZICKA et al., 2008).

Outra aplicação desse composto em processos de biorremediação ocorre em áreas com derramamento de compostos oleosos, onde sua aplicação promove o aumento da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), uma vez que causam um aumento na interação superficial água/óleo pela redução da tensão superficial sobre os grupos hidrofóbicos (FARIAS et al., 2014; MIGUEL et al., 2017).

O uso de biossurfactantes também tem se apresentando como uma ferramenta adicional para a remediação de áreas contaminadas com resíduos oleaginosos. Os microrganismos sintetizam uma variedade de bioemulsificantes com diferentes massas moleculares, como os glicolipídeos (trealose, soforolipídeos e ramnolipídeos) e os





O óleo de soja é mais comumente utilizado em processos de fritura de alimentos em domicílios, indústrias e comércios (JUÁREZ et al., 2011). Com o grande consumo de alimentos fritos, a geração do resíduo óleo de cozinha usado está cada vez maior. No Brasil, no ano de 2015, foram produzidos 205 milhões de litros de óleo de cozinha usado, onde apenas 2,5 % de todo esse óleo descartado foi reciclado, ou seja, todo o restante foi lançado diretamente no meio ambiente. Cada litro de óleo usado em frituras despejado nas redes de esgotos polui cerca de um milhão de litros de água (SABESP, 2016).

O descarte indevido desse óleo na rede de esgoto causa incrustações e entupimento das tubulações e, quando esse chega aos rios e represas, causa a contaminação da água, criando uma camada sobre a superfície, impedindo a entrada de luz e oxigênio, o que pode causar a morte de todo o ecossistema que vive naquele ambiente. No solo, o óleo pode chegar a contaminar os lençóis freáticos ou atrapalhar o desenvolvimento de plantas e microrganismos encontrados. Efeito negativo também é observado quando atinge os oceanos, pois reage com a água salgada produzindo gás metano, contribuindo para o aumento do aquecimento global (SABESP, 2016).

Desde 2002, planos integrados de gestão de resíduos em diferentes estados brasileiros têm trabalhado a conscientização da população para o descarte correto desse óleo e instalados postos de coletas desse resíduo nas cidades (CELLA; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2002; SANTOS et al., 2013). Algumas alternativas têm sido empregadas para reutilizar este resíduo coletado como, por exemplo, a produção de biodiesel, sabão e detergentes e massa de vidraceiro, bem como fonte de carbono em bioprocessos fermentativos para produção de compostos de interesse (NAVVABI et al., 2018; SANTOS et al., 2013).

Em bioprocessos, o óleo de soja tem sido utilizado como fonte de carbono para produção de biotensoativos. Estirpes de *Pseudomonas* (LMI 6c e LMI 7a) produziram ramnolipídios ( $9,69 \text{ gL}^{-1}$ ) com tensão superficial de  $31 \text{ mN/m}$ , tendo o óleo de soja usado em frituras como substrato (COSTA et al., 2006).

Outra aplicação deste óleo é como indutor para produção de lipases. Reinehr et al., (2014) utilizaram óleo de soja residual em fermentação submersa como indutor para produção de lipase pelos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. Estas enzimas, após serem produzidas, foram testadas quanto a atividade de esterificação, mostrando-se potencialmente promissoras a serem utilizadas em processos de produção de biodiesel.

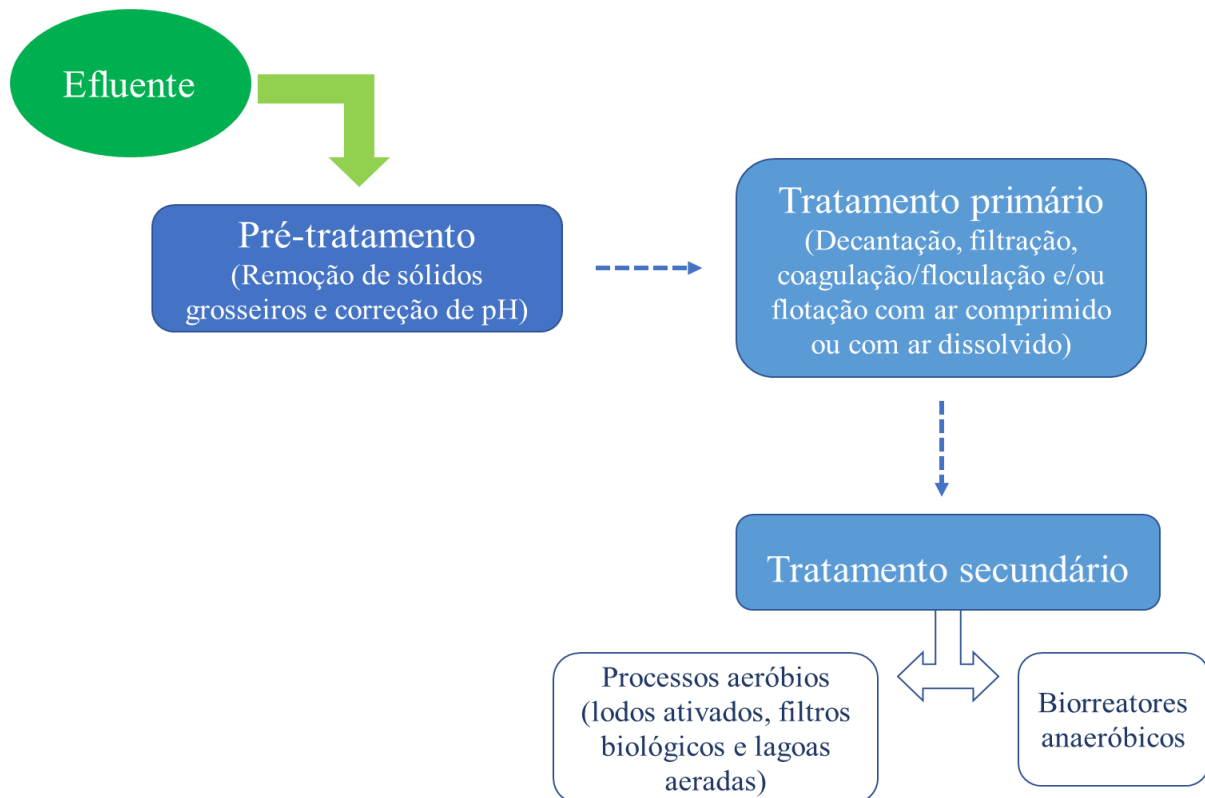
## **2.7 Rejeitos da indústria de laticínios**

A indústria de laticínios representa uma atividade de grande importância na economia brasileira e mundial (EMBRAPA, 2017). Esse é um setor presente em todos os estados Brasileiros, sendo considerado o mais expressivo da indústria de alimentos, isto devido sua importância econômica e social. O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite, representando 40% da produção nacional, e que abriga as maiores empresas do setor (EMBRAPA, 2019).

Diante da grande produtividade desse setor, surgem problemas relacionados aos resíduos gerados durante a produção (CAMMAROTA; FREIRE, 2006). São gerados efluentes líquidos compostos por leite, derivados diluídos e material sólido, principalmente substâncias graxas, detergentes e desinfetantes usados nas operações de limpeza, lubrificantes de máquinas e esgoto doméstico (ACERO et al., 2010; YONAR; SIVRIOĞLU; ÖZENGIN, 2018). Esses resíduos se tornam um problema ambiental devido aos seus altos teores de matéria orgânica, gorduras, sólidos suspensos e nutrientes (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DEBOWSKI, 2008; KAVITHA; GEETHA; JACQUELINE, 2019).

O tratamento convencional desses resíduos inclui o pré-tratamento seguido normalmente de tratamento primário com decantação, filtração, coagulação/floculação e/ou flotação com ar comprimido ou com ar dissolvido, para remoção de sólidos suspensos e gorduras. Em seguida é utilizado o tratamento secundário biológico em biorreatores anaeróbios ou lagoas aeróbias (gráfico 1) (HUNG; BRITZ; VAN SCHALKWYK, 2005).

**Gráfico 1.** Representação esquemática das etapas de tratamento de efluentes em uma estação de tratamento de efluentes ETEs em indústria de laticínios.



Fonte: Autoria própria (2022).

Os efluentes gerados podem apresentar altas concentrações de gorduras e matéria orgânica, esses podem dificultar a etapa de tratamento primário (GODOY et al., 2011). O acúmulo desses compostos podem gerar problemas como elevada produção de espuma, baixa sedimentação do lodo, dificuldades na remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e problemas na degradação de gorduras e óleos (HUNG; BRITZ; VAN SCHALKWYK, 2005; USMANI et al., 2022; YONAR; SIVRIOĞLU; ÖZENGİN, 2018), o que prejudica a eficiência do tratamento primário.

Esta é uma etapa que requer controle rigoroso das condições operacionais para garantir a eficiência de remoção de gordura, haja visto que altos níveis de gordura (acima de  $150 \text{ mgL}^{-1}$ ) causam vários problemas nos sistemas de tratamento biológico. Uma vez que essas gorduras apresentam baixa biodegradação, estas causam acúmulo em sistema de tratamento, provocando a deposição em filtros de reatores anaeróbio e aeróbio e inibição do metabolismo microbiano (SILVA et al., 2015).

Para contornar os problemas gerados pelo tratamento inadequado ou ineficiente deste resíduo, uma série de tecnologias têm surgido como forma de conversão e hidrólise desses componentes (YADAV et al., 2016). A utilização de biossurfactantes no processo de tratamento primário funciona como uma alternativa para a diminuição do alto teor de matéria

orgânica deste resíduo como DQO (demanda química de oxigênio) e DBO (demanda bioquímica de oxigênio) com valores na faixa de 1 a 10 g/L e 0,3 a 5,9 g/L respectivamente, bem como na quebra da tensão superficial desses óleos e gorduras, possibilitando que o tratamento secundário seja mais eficiente (USMANI et al., 2022).

Daverey et al., (2011) utilizaram cepas de *Candida bombicola* para a produção de soforolipídios (SLs) utilizando água residual obtida de uma indústria de laticínios. Os autores observaram rendimento máximo de 62 gL<sup>-1</sup> de SLs quando a levedura foi cultivada na água residual de laticínios suplementada com glicose (10% p/v), extrato de levedura (0,2% p/v) e óleo de soja (10% v/v). Foi possível observar também que o microrganismo foi capaz de propiciar eficiência de remoção de 80% de DQO do resíduo utilizado.

Utilizando águas residuais de laticínios como substrato e a levedura *Candida bombicola* como inóculo para produzir soforolipídeos, Daverey e Pakshirajan (2016) conseguiram alta remoção de gorduras e óleos das águas residuais (> 95% de remoção de DQO).

Dessa forma, biossurfactantes poderiam ser utilizados como substitutos de surfactantes sintéticos em estações de tratamento de efluentes de laticínio, uma vez que esses podem apresentar características emulsificantes, diminuição da tensão superficial e degradação de hidrocarbonetos, que auxiliariam nas etapas de remoção de gorduras do sistema de tratamento, além de possuírem propriedades como, baixa toxicidade e biodegradabilidade que não provocaria problemas no meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 329–345, 2009.
- ACERO, J. L. et al. Membrane filtration technologies applied to municipal secondary effluents for potential reuse. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 390–398, 2010.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23–29, 2012.
- BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007.
- BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 283–288, 2002.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.
- BORAH, S. N. et al. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* SS14 causes complete suppression of wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi in *Pisum sativum*. **BioControl**, v. 60, n. 3, p. 375–385, 2015.
- BRASIL. Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2011.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195–2210, 2006.
- CELLA, R. C. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 111–116, 2002.
- CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015.
- 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.

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483–488, 2006.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Treatment of dairy wastewater containing high amount of fats and oils using a yeast-bioreactor system under batch, fed-batch and continuous operation. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 12, p. 5473–5479, 2016.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K.; SUMALATHA, S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 13, n. 3, p. 481–488, 2011.

DE ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 6, p. 848–858, 2013.

DE CASTRO, A. et al. Production of 4-ethylphenol in alperujo by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 11, p. 2222–2227, 2015.

DE FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951–1957, 2011.

DELL'ANNO, F. et al. **Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018. v. 137

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 48, p. 77–90, 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Gado do Leite – Importância Econômica.

FARIAS, C. B. B. et al. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 122–125, 2014.

FAZAEIPOOR, M. H.; KHOSHDAST, H.; RANJBAR, M. Coal flotation using a biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* as a frother. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 5, p. 1527–1531, 2010.

FERRARI, R. A.; DA SILVA OLIVEIRA, V.; SCABIO, A. Biodiesel from Soybean: Characterization and consumption in an energy generator. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 19–23, 2005.

GAUR, V. K. et al. Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. **Bioresource Technology**, v. 272, n. August 2018, p. 19–25, 2019.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006.

GHOJAVAND, H. et al. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, n. 1–2, p. 172–176, 2008.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

GODOY, M. G. et al. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: Production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945–953, 2011.

GOMES, M. B. et al. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 231–242, 2018.

GONÇALVES, L. R. B. et al. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10–15, 2015.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; BHATTACHAJEE, S. S. Structures of yeast mannans containing both a- and P-linked *Dmannopyranose units*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 41, p. 1499–1505, 1968.

GUDIÑA, E. J. et al. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–675, 2013.

GUDIÑA, E. J. et al. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, n. 2015, p. 87–93, 2015.

GUO, Y. MING et al. Remediation of Pb-contaminated port sediment by biosurfactant from *Bacillus sp.* G1. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 27, n. 6, p. 1385–1393, 2017.

HAUN, W. et al. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, p. 934–940, 2014.

HUNG, Y.-T.; BRITZ, T.; VAN SCHALKWYK, C. Treatment of Dairy Processing Wastewaters. **Waste Treatment in the Food Processing Industry**, n. c, p. 1–28, 2005.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4199–4205, 2008.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, n. June, p.



109607, 2019.

JUÁREZ, M. D. et al. Degradation in soybean oil, sunflower oil and partially hydrogenated fats after food frying, monitored by conventional and unconventional methods. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1920–1927, 2011.

KAVITHA, V.; GEETHA, V.; JACQUELINE, P. J. Production of biodiesel from dairy waste scum using eggshell waste. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 125, p. 279–287, 2019.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731–1737, 1992.

KRISTENSEN, A. H. et al. Variability of soil potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons in a heterogeneous subsurface. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 573–580, 2010.

LIU, J. F. et al. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 4814–4837, 2015.

LIU, X. et al. Effect of themicrobial lipopeptide on tumor cell lines: Apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. **Protein and Cell**, v. 1, n. 6, p. 584–594, 2010.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, p. 1597–1605, 2012.

MARIN, C. P. et al. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 239–245, 2015.

MIGUEL, M. G. DA C. P. et al. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 362–369, 2017.

MONDAL, M. H. et al. Microbial assisted (*pseudomonas sp.*) production of novel biosurfactant rhamnolipids and its characterisation by different spectral studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 242, p. 873–878, 2017.

MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e Gorduras Vegetais: processamento e análises**. 1. ed. Florianópolis: Chemical Analysis, 1989.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure<sup>^</sup>function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 35, n. 1–3, p. 37–41, 2000.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application.

**Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736–747, 2008.

NAVVABI, A. et al. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. **Process Biochemistry**, v. 70, n. March, p. 61–70, 2018.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336–341, 2006.

RABBEE, M. F. et al. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1–14, 2019.

REINEHR, C. O. et al. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. . **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

RUZICKA, M. C. et al. Effect of surfactant on homogeneous regime stability in bubble column. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 4, p. 951–967, 2008.

SABESP. Programa de Reciclagem de Óleo de Fritura da Sabesp.

SANTA ANNA, L. et al. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. May, p. 1163–1169, 2008.

SANTOS, D. K. F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43–50, 2013.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.

SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 707–723, 2015.

SATHI REDDY, K. et al. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 291–299, 2016.

SEN, M.; DASTIDAR, M. G. Biosorption of Cr(VI) by resting cells of *Fusarium solani*. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering (Ijehse)**, v. 8, n. 2, p. 153–158, 2011.

SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Optimization of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa* PBS towards application for microbial enhanced oil recovery. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, 2018.

SILVA, J. D. F. DA et al. Microemulsions: Components, Characteristics, Potentialities in Food Chemistry and Other Applications. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196–1206, 2015.

SILVA, M. V. et al. Reciclagem de óleos residuais para a produção de sabão no município de Itapetinga-BA. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 9, n. 13, p. 106–120, 2012.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019.

SOUSA, J. R. et al. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* msic02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 431–441, 2014.

SUDHANSHU SHEKHAR, A. S. & T. B. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1522–1554, 2015.

SUN, S. et al. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 281, n. January, p. 421–428, 2019.

TEIXEIRA SOUZA, K. S. et al. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 152–158, 2018.

TENDULKAR, S. R. et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2331–2339, 2007.

TIELEMAN, D. P.; VAN DER SPOEL, D.; BERENDSEN, H. J. C. Molecular dynamics simulations of dodecylphosphocholine micelles at three different aggregate sizes: Micellar structure and chain relaxation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 27, p. 6380–6388, 2000.

USMANI, Z. et al. Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 346, n. November 2021, p. 126444, 2022.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–6, 2015.

VATER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 175–180, 2011.

WANG, C. et al. Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for Promoting the Growth of *Malus hupehensis* Rehd. and Inhibiting *Fusarium verticillioides*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–16, 2020.

WEI, Y. H.; LAI, C. C.; CHANG, J. S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 40–45, 2007.

WHANG, L. M. et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 1, p. 155–163, 2008.

YADAV, P. R. et al. Isolation, Screening and Optimization of process parameters for enhanced production of cellulase by solid state fermentation. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 28–35, 2016.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1329–1334, 2005.

YONAR, T.; SIVRIOĞLU, Ö.; ÖZENGİN, N. Physico-Chemical Treatment of Dairy Industry Wastewaters: A Review. In: **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing**. [s.l.] InTech, 2018. v. 32p. 137–144.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339–347, 2004.

YU, D. et al. Refined soybean oil wastewater treatment and its utilization for lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* 09 Engineering 0907 Environmental Engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO**

**Título:** Biosurfactant production by *Bacillus* spp. for use in dairy industry effluents

Elaborado de acordo com as normas do periódico Journal of Biotechnology

## ABSTRACT

Biosurfactants are metabolites that can be produced by different groups of microorganisms and that have wide application in different industrial sectors. Favorable characteristics such as: low toxicity, stability at different concentrations of pH, temperature, salinity and ability to reduce the surface tension of two fluid phases such as water/oil, make these compounds applicable in fatty effluent treatment plants. In this sense, the objective of this work was to select *Bacillus* strains for biosurfactant production using soybean oil used as a substrate, an alternative that adds a double aspect - *environment-friendly*. Subsequently, these compounds were tested for their efficiency in the treatment of effluent from the dairy industry. Using the droplet collapse test and  $\beta$ -hemolysis, it was possible to select three strains of the genus *Bacillus* spp., as biosurfactant producers, of which two belong to the species *Bacillus subtilis* CCMA 0658 and CCMA 2031 and one to the species *Bacillus velezensis* CCMA 0087. As a way of inducing biosurfactant production, the strains of *Bacillus* spp. were inoculated in a medium containing oil used as a carbon source. The crude biosurfactants produced by the three strains of *Bacillus* ssp. showed emulsifying and surface-active properties. Emulsification (IE<sub>24</sub>) was equal to or greater than 40%, oil scattering values were greater than 50% of the Petri dish diameter and surface tension less than 35 mN m<sup>-1</sup> for all three strains. The biosurfactants produced by strains CCMA 2031 and CCMA 0087 showed the best results when tested in dairy effluent, which indicates their potential for action as emulsifying and surface-active agents.

**Keywords:** Effluent treatment, bioremediation, soybean oil industrial waste, biological treatment.

## 1. INTRODUCTION

The dairy industry represents an activity of great importance in the Brazilian and world economy (EMBRAPA, 2017). This sector is considered one of the most expressive of the food industry, due to its economic and social importance (EMBRAPA, 2019). In 2021, Brazil produced a volume of 24,845 thousand tons of cow's milk, used for the production of milk and dairy products (CONAB 2021).

Faced with the great productivity of this sector, problems related to waste generated during production arise (CAMMAROTA; FREIRE, 2006). Liquid effluents composed of milk, diluted derivatives and solid material are generated, mainly fatty substances, detergents and disinfectants used in cleaning operations, machine lubricants and domestic sewage (ACERO et al., 2010; YONAR; SIVRIOĞLU; ÖZENGİN, 2018).

These residues become an environmental problem due to their high contents of organic matter, fats, suspended solids and nutrients (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DEBOWSKI, 2008; KAVITHA; GEETHA; JACQUELINE, 2019).

The effluents generated from these residues are treated in primary treatment stations with decantation, filtration, coagulation/flocculation and/or flotation with compressed air or with dissolved air, to remove suspended solids and grease. And biological secondary treatment in anaerobic bioreactors or aerobic lagoons (HUNG; BRITZ; VAN SCHALKWYK, 2005).

However, because they present high concentrations of fat and organic matter, these can make the primary treatment step and consequently the secondary treatment difficult (GODOY et al., 2011). To circumvent the problems generated by the inadequate or inefficient treatment of this effluent, the use of biosurfactants in the primary process would work as an alternative to reduce the high content of organic matter in this residue such as COD (chemical oxygen demand) and BOD (biochemical oxygen demand) with values in the range of 1 to 10 g/L and 0.3 to 5.9 g/L respectively, as well as in the reduction of surface tension and degradation of hydrocarbons, which would help in the process of removing fats from the treatment system (USMANI et al., 2022).

Biosurfactants are secondary metabolites produced by different groups of microorganisms. Bacteria of the *Bacillus* group are known for their metabolic versatility, including the production of biosurfactants with emulsifying, antimicrobial, antibiotic action,

inhibition of biofilm formation and hydrocarbon degradation, which allows their use in different industrial sectors and environmental applications (HARWOOD et al., 2018; LIU et al., 2015).

Despite the numerous advantages of using biosurfactant, the high cost of production and purification has limited its use. The use of low-cost substrates is an alternative to reduce these costs, since the substrates used for production represent about 30% of the total cost of most biotechnological processes (JIMOH; LIN, 2019; MUTHUSAMY et al., 2008).

Soybean oil is widely used in households, restaurants and snack bars (SANTOS et al., 2013), being most of this oil is discarded directly into the environment causing contamination of soil, water table, rivers and lakes (SILVA et al., 2012). Alternatives for using this oil is its reuse in the manufacture of soap, detergent, biodiesel and putty (SANTOS et al., 2013). However, the large volume generated and access to correct disposal is still a challenge.

Thus, alternatives for the reuse of this oil are necessary. One of them is its use as a carbon source in microbial bioprocesses, such as for the production of biosurfactants (JIMOH; LIN, 2019; REINEHR et al., 2014).

Considering the above, this work aimed to promote the production of biosurfactant by *Bacillus* strains using soybean oil used as a carbon source, with desirable chemical characteristics for the treatment of dairy effluent.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Selection of strains producing biosurfactants

Nine strains of *Bacillus* belonging to the Agricultural Microbiology Culture Collection (CCMA) of the Biology Department of the Federal University of Lavras (Brazil) were tested for biosurfactant production (Table 1).

**Table 1.** Strains *Bacillus* spp. belonging to the Agricultural Microbiology Culture Collection of the Department of Biology at UFLA-CCMA and their respective isolation origins in Brazil.

Strains	Insulation substrate
CCMA 0054	Fruit of the cerrado Pimenta - do - Mato
CCMA 0087	Fruit of the cerrado <i>Annona crassiflora</i>
CCMA 0401	Chicha of rice
CCMA 0551	Dry coffee fermentation
CCMA 0658	Cocoa fermentation
CCMA 1228	Pulped coffee, wet fermentation



CCMA 1287	Coffee fermentation water
CCMA 1340	Strawberry leaf endophytic
CCMA 2031	Alperujo

---

The strains were reactivated in suspension of 0.1 mL of bacteria in microtubes containing 0.9 mL of Caldo Nutriente (g/L-1): 3 g of meat extract and 5 g of peptone and incubated at 28 °C for 48 hours.

All *Bacillus* strains were subjected to preliminary tests to detect the production of biosurfactants:

1) *Plaque hemolysis*: Microdrops of *Bacillus* strains were inoculated with a population of 8 log CFU mL<sup>-1</sup> standardized on McFarland scale 1 in 10% tryptone soy agar culture medium (TSA, bacto™ Bd, USA), supplemented with 5 % (v/v) defibrinated bovine blood. After incubation for 48 h at 37 °C, colonies that showed formation of hemolysis zones on blood agar were selected as potential producers of biosurfactants (YOUSSEF et al., 2004).

2) *Droplet collapse*: All strains were subjected to the droplet collapse method (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998). Each *Bacillus* strain alone was inoculated into test tubes containing 3 mL of nutrient broth and placed in BOD at 22 °C for 7 days, the population of 8 log CFU mL<sup>-1</sup> was standardized using a McFarland 1 scale. After this period, was added in beaker of 50 mL, 35 mL of water and 100 µL of soybean oil, with the formation of a single drop of oil on the surface of the water, then 10 µL of bacterial culture was added. The observation of total or partial droplet scattering was considered a positive result. In cultures where the drop remained unchanged were considered as negative results to indicate the production of biosurfactant. The negative control was performed by adding 10 µL of sterile liquid nutrient broth to the drop without previous inoculation.

### 2.1.2 Genetic characterization of surfactin, fengycin and iturin genes

The strains that presented positive results in the previous tests were tested for the presence of the surfactin, fengycin and iturin genes. These were reactivated on nutrient agar (NA) at 28 °C for 24 h for DNA extraction with kit ZymoBIOMCS™ DNA Kit Sample. The

DNA was amplified using the primers and conditions described in Table 2 (PLAZA et al., 2015).

The PCR mixture was prepared as follows: 1x buffer solution of PCR, 2,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 210 nM each initiator, 250 μM de dNTPs, 0,02 U Taq DNA polymerase (PROMEGA™, Madison, EUA), and 3 μl of template DNA, resulting in a final volume of 25 μl. Amplifications were performed using a thermocycler GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The amplification program consisted of 4 min at 95 °C followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, annealing for 30 s at different temperatures depending on the primer used, extension step of 1 min at 70 °C and with a final extension of 5 min at 70 °C.

Aliquots 3 μl of the amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1%) and stained with SYBR Green® and visualized in a transilluminator.

**Table 2.** Primers used to trace the biosynthesis of lipopeptide biosurfactant (LPs) (PLAZA et al., 2015).

	Gene	Sequence	PCR product size (bp)	Annealing temperature (°C)
Surfactin	Sfp	F-50 ATGAAGATTTACGGAATTTA 30 R-50 TTATAAAAGCTCTTCGTACG 30	675	48 – 52
	srfAA	F-50 TCGGGACAGGAAGACATCAT 30 R-50 CCACTCAAACGGATAATCCTGA 30	201	58 – 60
Fengycin	fenB	F-50 CCTGGAGAAAGAATATAACCGTACCY 30 R-50 GCTGGTTCAGTT KGATCACAT 30	670	58 – 65
	fenD	F-50 GGCCCGTTCTCTAAATCCAT 30 R-50 GTCATGCTGACGAGAGCAAA 30	670	58 – 65
Iturin	ituD	F-50 TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT 30 R-50 TGCGMAAATAATGGSGTCGT 30	482	57 – 58
	ituC	F-50GGCTGCTGCAGATGCTTTAT 30 R-50 TCGCAGATAATCGCAGTGAG 3	423	58

## 2.2 Identification of *Bacillus* strains

The three strains of *Bacillus* ssp. selected as biosurfactant producers were initially identified by the 16s gene as belonging to the species *Bacillus subtilis* group. To confirm the species, the following sequencing was performed:

*Gene (rpoD)* – Amplification was performed in a Veriti thermocycler (Thermo), in a reaction containing 20 ng of purified genomic DNA. For the rpoD region, 32 cycles of denaturation (96°C for 30 sec), primer annealing (55°C for 45 sec) and product extension (72°C for 45 sec) were used. The products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose (TAE buffer). Reactions were enzymatically purified with ExoI/SAP (Thermo), as recommended by the manufacturer.

*Gene (gyrB)* - Sanger sequencing was used. The PCR products were labeled with BigDye v3.1 (Thermo) according to the manufacturer's instructions, in a reaction containing 50 ng of DNA. Thirty-five cycles of denaturation (96°C for 15 sec), annealing of the respective primer (15 sec, at 55°C) and product extension (60°C for 4 min) were used for labeling with fluorescent terminators. The labeled products were precipitated with 20% 7.5M ammonium acetate and three volumes of absolute ethanol, and resuspended in 10 µL of HiDi-formamide. These samples were sequenced in Genetic Analyzer 3500xL (Thermo), using 50 cm capillaries with Pop7 polymer (Thermo), according to the manufacturer's instructions. The generated electrophoretograms were converted into a base sequence using the Sequencing Analysis v5.4 program (Thermo).

Both sequencing was performed in the GoGenetic (Curitiba, PR, Brazil).

### **2.3 Biosurfactant production by *Bacillus***

The culture medium for biosurfactant production consisted of 485 mL of water and 15 mL of used soybean oil (3%) (m/v); 0.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3.6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.35g NaCl; 0.3g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0.0075g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0.001g MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O e 2.5g yeast extract (modified from Morán et al., 2000). Used cooking oil was obtained from only one residence in sufficient volume for the entire experiment, which was used only once in the frying process.

To prepare the inoculum, the previously selected *Bacillus* strains were grown in nutrient broth for 24h until obtaining a population of 8 log CFU mL<sup>-1</sup> standardized on McFarland scale 1 corresponding to the final population of 3x10<sup>8</sup> CFU/mL. Subsequently, the cells were washed with sterile distilled water, centrifuged and inoculated in the medium to produce the biosurfactant.

Two cultivation systems were tested to evaluate the interference in biosurfactant production: **1) Fermentation With Stirring (FWS)** - Incubation in orbital shaking at 200 rpm, 30 °C, pH 6.7 for 5 days; **2) Fermentation Without Agitation (FWA)** - Incubation in orbital shaking at 200 rpm, 30°C, pH of 6.7 for 24h, and after this period for 4 days static (adapted from Fernandes et al., 2016).

At the end of the cultivation period of both fermentations, the biosurfactant was recovered by acid precipitation.

## **2.4 Biomass production**

Biomass production was measured at the end of fermentation. The assays were centrifuged at  $5000 \times g$  at 4 °C for 10 minutes and dried in an oven at 65 °C until constant dry weight was obtained.

## **2.5 Biosurfactant recovery**

Thirty mL aliquots of each culture were centrifuged at  $12,000 \times g$  for 20 min at 20°C to remove cells. Then, the pH of the supernatant was adjusted to 2 by adding 6 M HCl, with subsequent storage at 4 °C for 12 h. The samples were then centrifuged at  $9000 \times g$  for 20 min and the supernatant discarded.

## **2.6 Evaluation of the biosurfactant produced**

### **2.6.1 Measurement of surface tension**

After acid precipitation, the crude extracts of the biosurfactants were dried in an oven at 65 °C until constant dry weight was obtained and resuspended in deionized water with pH adjusted to 7. To measure the surface tension values, the samples obtained were analyzed in a digital tensiometer (Dataphysics, DCAT 21), measured by the *Wilhelmy plate* method, considering 0.03 as the limit value of the standard deviation.

### **2.6.2 Oil spreading test**

The modified oil spread test method (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000) was used to assess oil displacement activity. To perform the test 30 ml of distilled water was added to a Petri dish followed by the addition of 1 ml of olive oil and 20 µl of cell-free culture medium added to the surface of the oil. The presence of the biosurfactant in the cell-free culture medium promotes oil displacement on the water surface. As a negative control, the same test was performed using sterile culture medium.

### 2.6.3 Emulsification index (IE)

The emulsification index was determined using soybean oil and biodiesel. A 2 ml aliquot of the cell-free fermented medium and 2 ml of biodiesel or soybean oil were added to test tubes and vortexed for 2 minutes. After 24 h, the emulsion index (IE) was determined by the following equation (1) (COOPER; GOLDENBERG, 1987):

$$IE_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100 \quad (1)$$

IE<sub>24</sub> = Emulsification Index (%)

He = Height of the emulsified layer (cm)

Ht = Total height of liquid (cm)

## 2.7 Treatment of effluent from the dairy industry

The biosurfactants from the Fermentation With Stirring - FWS produced by *Bacillus* strains CCMA0087, CCMA 0658 and CCMA 2031 were used, in bench scale, for preliminary treatment of dairy effluent. The effluent used was collected in a dairy industry located in the city of Perdões, Minas Gerais, Brazil. The synthetic surfactant sodium oleate was used as a positive control.

### 2.7.1 Biosurfactant and surfactant saponification

Crude biosurfactants, obtained from acid precipitation after fermentation, were saponified before being used in the dairy effluent. For the preparation, 1.0 g of the biosurfactant was dissolved in 30 ml of distilled water, pH was adjusted to 11.5 using 10%

w/v sodium hydroxide solution, under stirring with a magnetic stirrer at 100 rpm. After saponification, the solution was diluted with distilled water to 90 mL and the pH adjusted again to 11.5. The solution was transferred to a 100 mL volumetric flask, making up to volume with distilled water. Sodium oleate, used as a positive control, was subjected to the same procedure (MENEZES et al 2011).

### **2.7.2 Application in dairy effluent**

The action of biosurfactants and surfactant in the dairy effluent was analyzed according to the methodology proposed by Menezes et al. (2011) adapted. The tests were carried out in a beaker filled with 100 mL of effluent, and the biosurfactant samples were added in volumes of 5 mL and 2.5 mL. Assays were maintained on a magnetic stirrer at 40 rpm/15 minutes. After the treatment, pH measurement in digital phmeter, emulsification activity and chronic toxicity were performed.

To evaluate the efficiency of the biosurfactant in the effluent, sodium oleate (synthetic surfactant) was used as a positive control, which was submitted to the same conditions described above.

### **2.7.3 Emulsification Index**

The emulsification index was performed following the methodology described above, using soybean oil in the dairy effluent before and after the addition of biosurfactants and sodium oleate in the volume of 5 mL and 2.5 mL separately.

### **2.7.4 Subchronic Toxicity Analysis**

The toxicity of dairy effluent before and after application of biosurfactants and surfactant was evaluated in onion (*Allium cepa*) (Sobrero et al. 2004) with modifications. For this, the effluent without application and the effluent after application of the biosurfactants produced by the strains CCMA0087, CCMA 0658 and CCMA 2031 and sodium oleate in two different volumes (5 mL and 2.5 mL) and in three different concentrations (25, 50 and 100%) and distilled water (as a control) negative.

The seeds were distributed on filter paper inside Petri dishes and soaked by the concentration tested, these were incubated at 22°C for 10 days in the absence of light. The analysis was performed in triplicate, containing 15 seeds for each concentration.

After the incubation period, the number of germinated seeds and the root length were analyzed.

The relationship between the samples and the control was used to calculate the relative germination of the roots (RG) (Equation 2), root length (RL) (Equation 3) and the germination index (GI) (Equation 4):

$$RG (\%) = \frac{\text{Number of germinated seeds}}{\text{Number of control germinated seeds}} \times 100 \quad (2)$$

$$RL (\%) = \frac{\text{Average root length}}{\text{Average root length control}} \times 100 \quad (3)$$

$$GI (\%) = \frac{RG\% \times RL\%}{100} \quad (4)$$

## 2.8 Statistical analysis

The experiment was accomplished in a completely randomized design

Biomass production and biosurfactant production were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the Scott-Knott test was used to compare the means considering the interactions between the factors.

For the biomass production test, a 2 x 3 factorial arrangement was used to analyze data from fermentation methods and microorganisms.

For the biosurfactant production test, a 2 x 3 factorial arrangement was used to analyze data on fermentation conditions and microorganisms.

For hemolytic activity tests, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were performed to identify significant differences between means using the Statistica® 8.0 software, at a 5% significance level.

All analyzes were performed in triplicate and the results presented as mean  $\pm$  standard deviation.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Selection of *Bacillus* strains producing biosurfactants

The selection of strains producing biosurfactants was carried out through tests that allowed verifying characteristics indicative of the production of these compounds. The hemolytic activity test is one of the main methods used to select biosurfactant-producing microorganisms (GAUR et al., 2019).

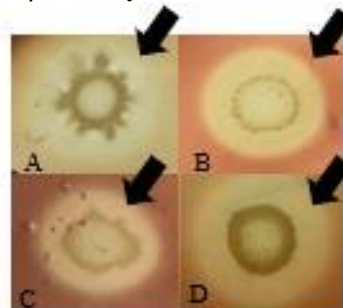
Of the nine strains of *Bacillus* submitted to evaluation of production by determining the hemolytic activity, four strains (CCMA 0087, CCMA 0551, CCMA 0658 and CCMA 2031) showed zones of  $\beta$ -hemolysis (Table 3 and Figure 1), with the formation of a clear or light-yellow halo around bacterial colonies, indicative of the presence of biosurfactant (SOLTANIGHIAS et al., 2019).

**Table 3.** Selection of potential biosurfactant-producing strains through the test to detect hemolytic activity.

Strains	$\beta$ -hemolysis
CCMA 0551	(+)
CCMA 0054	(-)
CCMA 0087	(+)
CCMA 0401	(-)
CCMA 0658	(+)
CCMA 1228	(-)
CCMA 1287	(-)
CCMA 0134	(-)
CCMA 2031	(+)

(-) Negative hemolysis;  
(+) Positive hemolysis.

**Figure 1.** Image of the results obtained with the test to detect hemolytic activity. The strains A) CCMA 0551, B) CCMA 0087, C) CCMA 0658 and D) CCMA 2031 were highlighted, which showed positive values for the formation of  $\beta$ -hemolysis zones.





To complement the results, the nine strains were submitted to the droplet collapse test, where the supernatants of six bacteria showed no change on the oil droplet and three strains caused the droplet collapse (CCMA0087, CCMA 0658 and CCMA 2031) being identified as potential producers of biosurfactant.

Safary et al., (2010) selected microorganisms capable of producing biosurfactants using the droplet collapse test and hemolytic activity and obtained good results with the selection. This demonstrates that the droplet collapse test when used in conjunction with hemolytic activity is efficient in the selection of microorganisms that produce surfactant compounds. From the tests carried out, strains CCMA0087, CCMA 0658 and CCMA 2031 were selected as potential producers of biosurfactant because they presented positive results in both tests.

The results of the PCR screening revealed amplification of the fengicin gene only for the CCMA 0658 isolate, with no detection of other genes in the other strains.

### **3.2 Identification of *Bacillus* strains**

DNA sequencing (rpoD) confirmed the subsequent identification of strains CCMA 0658 and CCMA 2031 as belonging to the species *Bacillus subtilis*, with percentages of similarity of 99.27 and 99.63%, respectively.

The CCMA 0087 strain that was previously classified as *Bacillus subtilis* was identified through gene sequencing (gyrB) as being from the *Bacillus velezensis* species, with a similarity percentage of 99.90%.

Bacteria of the *Bacillus subtilis* species are known to be capable of producing three of the main types of lipopeptide-type biosurfactants: iturins, fengicins and surfactins (KIM et al., 2021), which have high surfactant power, antimicrobial and antibiotic activity (WANG et al., 2020; WEI; LAI; CHANG, 2007) enabling wide industrial and environmental application.

*Bacillus velezensis* is a new species of *Bacillus* that has been widely studied for producing biosurfactants with antifungal properties, which gives this bacterium great interest for agro-industrial applications (KIM et al 2021; WANG et al 2020).

### **3.3 Biosurfactant production**

The aeration caused by the agitation of the culture medium or the absence of it is one of the main factors known in the literature to be able to affect the production of biosurfactant (FERNANDES et al., 2016).

Constant agitation in the culture medium causes oxygenation, which can provide greater production of the compound of interest. However, there are studies that report an increase in the biosurfactant produced when the microorganism is faced with a stress condition. The absence of constant oxygenation during fermentation can cause oxygen saturation in the culture medium, which can lead to a higher yield in the production of biosurfactant by different species of microorganisms (FERNANDES et al., 2016; GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

In studies carried out by Fernandes et al., (2016) a better yield of surfactin (633.71 and 615.86 mg L<sup>-1</sup>) was observed when the strain *Bacillus subtilis* RI4914 was submitted to fermentation without agitation for 15 days. In order to test the influence of this factor, the strain of *B. velezensis* CCMA 0087 and the strains of *B. subtilis* CCMA 0658 and CCMA 2031 were submitted to two different types of fermentation, one with constant agitation of 200 rpm for 5 days and the second under agitation for 24 hours only, in order to allow the necessary cell growth, and kept at rest for the remaining 4 days.

### 3.4 Biomass production

The strain of *B. velezensis* CCMA 0087 showed higher biomass production in both fermentations while *B. subtilis* CCMA 2031 showed values of 7.54 and 6.77 gL<sup>-1</sup>, respectively, for the Fermentation With Stirring (FWS) and Fermentation Without Agitation (FWA) respectively, with the lowest biomass values obtained (table 4).

From the statistical analysis, it was possible to observe that the interactions between the factors were not significant, since  $p > 0.05$ . That is, the treatment factor is independent of the microorganism factor. Thus, we realize that in this case the production of biomass is independent of the type of fermentation used, as the microorganisms will behave in the same way.

**Table 4.** Dry biomass (gL<sup>-1</sup>) obtained from cultures of three strains of *Bacillus* in medium containing soybean oil used for biosurfactant production.

Type of fermentation	Microorganism	Biomass
FWS	<i>B. velezensis</i> CCMA 0087	3.53 b
FWS	<i>B. subtilis</i> CCMA 0658	2.77 a

FWS	<i>B. subtilis</i> CCMA 2031	2.50 a
FWA	<i>B. velezensis</i> CCMA 0087	2.83 a
FWA	<i>B. subtilis</i> CCMA 0658	2.67 a
FWA	<i>B. subtilis</i> CCMA 2031	2.23 a

\* The interaction for this response variable was not significant,  $p > 0.05$ ; therefore, the factors were evaluated separately.

### 3.5 Evaluation of the biosurfactant produced

The emulsification test was used in order to determine the ability of the biosurfactant to promote the emulsion of hydrocarbons (IBRAHIM, 2021). Indexes greater than 40% indicate the formation of stable emulsions, which is considered a desirable characteristic. (YOUSSEF et al., 2004; DIAS, 2017).

All three strains were able to produce biosurfactants with IE<sub>24</sub> equal to or greater than 40% in Fermentation With Stirring (FWS) in soybean oil, with the highest value of 53% obtained by *Bacillus subtilis* CCMA 0658. In biodiesel the values were 20 and 50% for strains CCMA 2031 and CCMA 0658, respectively (Table 5).

*Bacillus velezensis* CCMA 0087 promoted an emulsification of 40% in soybean oil and only 5% in biodiesel, these data may indicate a lower affinity of the biosurfactant for biodiesel (UZOIGWE et al., 2015).

**Table 5.** Emulsification Index values in soybean oil and biodiesel of biosurfactants produced by *Bacillus* strains cultivated in two types of fermentation.

Bacteria	Emulsification Index (%) (EI <sub>24</sub> )			
	FWS		FWA	
	Soybean Oil	Biodiesel	Soybean Oil	Biodiesel
<i>B. velezensis</i> CCMA 0087	40% b	5% c	1% b	1% b
<i>B. subtilis</i> CCMA 0658	53% a	50% a	2% a	2% a
<i>B. subtilis</i> CCMA 2031	50% a	20% b	1% b	1% b

\*Means followed by the same letter in the columns do not differ statistically from each other, according to Tukey's test at 5% probability.

The emulsifying activity of biosurfactants produced in Fermentation Without Agitation (FWA) showed lower values for all strains, some showed extremely thin and difficult to measure emulsion layers.

These results were observed for tests carried out on both soybean oil and biodiesel, with rates of 1%. This behavior can be explained by the structural chemical difference between the biosurfactant molecules (UZOIGWE et al., 2015).

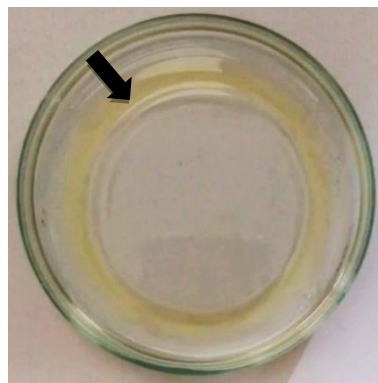
The biosurfactants produced in the Fermentation With Stirring (FWS) by the three strains showed good emulsifying activity, since they were able to emulsify soybean oil at values equal to or greater than 40% and maintained the emulsification stable for at least 24h.

The results of the oil spreading test were promising, since the biosurfactant produced by the three strains in both fermentations were able to form oil spreading halos that occupied more than 50% of the Petri dish diameter (Figure 2). The halos formed spontaneously soon after the addition of the supernatant. No oil return was observed in the test of any of the strains, indicative of the formation of a stable halo.

Microorganisms can produce biosurfactants with different physicochemical characteristics, some have high emulsifying activity while others have a greater action in reducing surface tension (YOUSSEF et al. 2004).

Accordingly, Usmani et al., (2021) these differences are due to the molecular weight of the biosurfactants, the high molecular weight ones have a greater affinity in stabilizing oil and water emulsions, while the low molecular weight ones can present better action in the reduction of the interfacial and surface. These characteristics may explain the lower emulsifying activity observed in the present work.

**Figure 2.** Halo formation (indicated by the arrow) after application of the biosurfactant produced by the strain *B. subtilis* CCMA 2031.



Youssef et al., (2004) concluded that the scattering test is one of the most efficient methods for proving the presence of biosurfactants, with the forming diameter being proportional to the biosurfactant concentration. Furthermore, it is possible to infer the

surfactant activity of the produced metabolite by measuring the diameter. This relationship was observed by Morikawa, Hirata and Imanaka (2000) in a study that found that as the surface tension was reduced by the addition of the biosurfactant, an increase in the area of halo formation was observed.

These results corroborate the results obtained in the relationship between halo diameter and surface tension in the present study.

### 3.5.1 Superficial tension

The biosurfactants produced by the three strains of *Bacillus* in both fermentations are able to significantly reduce the surface tension between complex hydrocarbons such as crude oil and water.

The surface tension results were considered effective since it was possible to reduce the water surface tension value from  $71.6 \text{ mN m}^{-1}$  to values below  $36 \text{ mN m}^{-1}$ , highlighting the strains of *Bacillus velezensis* CCMA 0087 and *Bacillus subtilis* CCMA 2031 that show a reduction in surface tension to  $29 \text{ mN m}^{-1}$  (Table 6).

Second Ge et al., (2015), biosurfactants that reduce surface tension to values below  $35 \text{ mN m}^{-1}$  are promising for different applications, the decrease in surface tension has wetting, spreading, penetrating effects and increased absorption speed, allowing the application of biosurfactant extract in processes of recovery of oil, in the biodegradation of contaminants, since they increase the contact between this and the microorganism, and thus can be used in bioremediation processes (Fernandes et al., 2016).

**Table 6.** Surface tension values determined for biosurfactants produced in Fermentation With Stirring (FWS) and Fermentation Without Agitation (FWA) using strains of *Bacillus*.

Bacteria	Type of fermentation	
	FWS	FWA
<i>B. velezensis</i> CCMA 0087	29.14 aA	34.75 bA
<i>B. subtilis</i> CCMA 0658	34.18 aB	35.58 bA
<i>B. subtilis</i> CCMA 2031	30.00 aA	34.04 bA

\* Different lowercase letters, significant difference in line. Different capital letters, significant difference in column.

Bacteria cultivated in FWS showed the highest values of surface tension reduction,  $29.1 \text{ mN.m}^{-1}$  and  $29.9 \text{ mN.m}^{-1}$  for strains *B. velezensis* CCMA 0087 and *B. subtilis* CCMA 2031 respectively. The *B. subtilis* CCMA 0658 strain showed the lowest surface tension reduction value,  $35.5 \text{ mN.m}^{-1}$ , when cultivated using the methodology used in FWA.

The surface tension values were significant in relation to the interaction between the factors, since  $p < 0.05$ , showing that they depend on each other. That is, the type of fermentation and the strain of bacteria influence the surface tension values obtained.

The results obtained with the emulsification index, oil spreading and surface tension tests indicated that the tested strains are capable of producing biosurfactants with surface-active and emulsifying properties.

### 3.6 Application in dairy effluent

The action of biosurfactants produced by *Bacillus velezensis* CCMA 0087 and *Bacillus subtilis* CCMA 0658 and CCMA 2031 were tested in the effluent of the primary treatment plant of the dairy industry. The replacement of surfactant by biosurfactants has as a proposal the use of environmentally friendly compounds. Two volumes of biosurfactant, 5 mL and 2.5 mL, were tested, but no significant differences were noted in the results from one volume to the other.

The pH values remained within the standard required for the discharge of treated effluents to water resources, according to the legislation of the CONAMA (2011). The pH of the effluent after the application of the tests with biosurfactants (values of 7.0 and 6.9 for strain *Bacillus velezensis* CCMA 0087, 6.9 and 6.8 for strains *Bacillus subtilis* CCMA 0658 and CCMA 2031), demonstrating the stability of the effluent biosurfactant in maintaining the pH of the effluent. sample.

The emulsification index test showed indexes of 25% for biosurfactants produced by the strains *B. velezensis* CCMA 0087 and *B. subtilis* CCMA 2031 and index of 0% for those produced by *B. subtilis* CCMA 658 and for sodium oleate. There were no changes in the values of the emulsification indexes when tested in the different concentrations of biosurfactant added to the effluent, which means that variations in their concentrations do not influence the results of this characteristic (Bosch et al. 1988).

One of the main problems faced by seasons that treat fatty effluents is the difficulty in the process of removal and hydrolysis of these. High levels of hydrocarbons impair treatment in biological systems and cause grease to accumulate in equipment and pipes (SILVA et al., 2015), thus, biosurfactants produced by strains *B. velezensis* CCMA 0087 and *B. subtilis* CCMA 2031 could promote greater solubility of fats present in these effluents, thus replacing surfactants of chemical origin that can be harmful to the environment in the process of releasing treated effluents into water bodies.

### 3.6.1 Subchronic toxicity

Phytotoxicity of dairy effluent before and after application of biosurfactants and surfactant was evaluated in onion seeds (*Allium cepa*) considering the percentage of relative root germination (RG%), root length (RL%) and germination index (GI %) (Table 7).

Seed germination was observed in all tests at all concentrations using biosurfactants, which may be related to a possible hydrolysis of fats present in the effluent. These could be harming the germination of seeds as observed in the in natura effluent, which did not show any germination. The application of larger volumes of biosurfactant could be an alternative to cause a decrease in the concentration of fats in the effluent (DRAKONTIS; AMIN, 2020).

No germination was noticed in the tests with the synthetic surfactant, the cause of this result may be related to the toxic characteristics observed in surfactants of chemical origin (GOMES et al., 2018).

**Table 7.** Relative root germination (RG%), root length (RL%) and germination index (GI%) obtained in the analysis of subchronic toxicity with onion seeds (*Allium cepa*) in samples of in natura dairy effluent, dairy effluent with sodium oleate, biosurfactants produced by strains of *Bacillus velezensis* CCMA 0087 and CCMA 0658 and *Bacillus subtilis* at concentrations of 5 and 2.5 mL.

Amostra/Mídia	RG			RL			GI		
	25%	50%	100%	25%	50%	100%	25%	50%	100%
In natura effluent	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sodium oleate / 5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CCMA 0087 / 5	11.11a	33.33a	44.44a	0.00	50	0.00	0.00	16.66	0.00
CCMA 0658 / 5	33.33a	44.44a	44.44a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CCMA 2031 / 5	11.11a	11.11a	22.22a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sodium oleate / 2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CCMA 0087 / 2.5	33.33a	44.44a	44.44a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CCMA 0658 / 2.5	33.33a	33.33a	44.44a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CCMA 2031 / 2.5	33.33a	44.44a	44.44a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

\*Means followed by the same letter on the lines do not differ statistically from each other, according to Tukey's test at 5% probability.

Root growth was observed only in the assays with biosurfactant produced by the strain of *Bacillus velezensis* CCMA 0087 (50%), in the concentration of 50% of the effluent treated with the biosurfactant, however the germination index (GI) was below the desired value for be indicated as absence of phytotoxicity, according to Tiquia, Tam and Hodgkiss (1996) the desired values are greater than 80% and in the present work we obtained only 16.6%,

demonstrating how the effluent can be toxic if discarded without treatment in the environment.

#### 4. CONCLUSIONS

*Bacillus* strains CCMA 0658 and CCMA 2031 belonging to the species *Bacillus subtilis* and the strain CCMA 0087 identified as *Bacillus velezensis*, were selected as biosurfactant producers and were able to produce biosurfactant using soybean oil used as a carbon source. Emulsification index (IE<sub>24</sub>) results, equal to or greater than 40%, oil spreading values greater than 50% of the Petri dish diameter and surface tension less than 35 mN m<sup>-1</sup>, were obtained by the three strains.

The biosurfactant produced has emulsifying and surfactant characteristics that allowed its effluent application from the dairy industry. To improve the study, biochemical analyzes of the effluent before and after the action of the biosurfactant are necessary, as well as tests with larger volumes of biosurfactants applied to the effluent.

#### 5. REFERENCES

- ABDELHAFIZ, Y. A. et al. Draft Genome Sequence of a Biosurfactant-Producing *Bacillus subtilis* UMX-103 Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil in Terengganu, Malaysia. **Current Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 803–805, 2017.
- ACERO, J. L. et al. Membrane filtration technologies applied to municipal secondary effluents for potential reuse. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 390–398, 2010.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.
- BOSCH, M. P. ET AL. Surface-active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfact. Det**, v. 25, p. 208–211, 1988.



CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195–2210, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Análise mensal do leite.

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.

DE FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951–1957, 2011.

DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 48, p. 77–90, 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Gado do Leite – Importância Econômica.

FERNANDES, P. L. et al. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 180, p. 551–557, 2016.

GAUR, V. K. et al. Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. **Bioresource Technology**, v. 272, n. August 2018, p. 19–25, 2019.

GE, J.; WANG, Y. Surfactant Enhanced Oil Recovery in a High Temperature and High Salinity Carbonate Reservoir. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 18, n. 6, p. 1043–1050, 2015.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

GODOY, M. G. et al. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: Production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945–953, 2011.

GOMES, M. B. et al. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 231–242, 2018.

HARWOOD, R.; MOUILLON, J.; POHL, S. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. n. July 2018, [s.d.].

HUNG, Y.-T.; BRITZ, T.; VAN SCHALKWYK, C. Treatment of Dairy Processing Wastewaters. **Waste Treatment in the Food Processing Industry**, n. c, p. 1–28, 2005.

IBRAHIM, S.; DIAB, A.; ABDULLA, H. Bio-cleaning Efficiency of Rhamnolipids Produced from Native *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Agro-industrial By-products for Liquid Detergent Formulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 8, p. 2616–2633, 2021.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4199–4205, 2008.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, n. June, p. 109607, 2019.

KAVITHA, V.; GEETHA, V.; JACQUELINE, P. J. Production of biodiesel from dairy waste scum using eggshell waste. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 125, p. 279–287, 2019.

KIM, Y. S. et al. Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

LIU, J. F. et al. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 4814–4837, 2015.

MENEZES, C. T. B. et al. Replacing synthetic with microbial surfactants as collectors in the treatment of aqueous effluent produced by acid mine drainage, using the dissolved air flotation technique. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 4, p. 540–546, 2011.

MORÁN, A. C. et al. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* 09. **Biodegradation**, v. 11, n. 1, p. 65–71, 2000.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure^function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 35, n. 1–3, p. 37–41, 2000.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736–747, 2008.

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

PŁAZA G, CHOJNIK J, RUDNICKA K, PARASZKIEWICZ K, BERNAT P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. **J Appl Microbiol**. 2015 Oct;119(4):1023-34. doi: 10.1111/jam.12893. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26171834.

REINEHR, C. O. et al. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. . **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

SAFARY, A. et al. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from caspian sea. **Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 378–382, 2010.

SANTOS, D. K. F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43–50, 2013.

SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 707–723, 2015.

SILVA, J. D. F. DA et al. Microemulsions: Components, Characteristics, Potentialities in Food Chemistry and Other Applications. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196–1206, 2015.

SILVA, M. V. et al. Reciclagem de óleos residuais para a produção de sabão no município de Itapetinga-BA. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 9, n. 13, p. 106–120, 2012.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Imta**, p. 55–67, 2004.

SOLTANIGHIAS, T. et al. Assessment of biosurfactant-producing bacteria from oil contaminated soils and their hydrocarbon degradation potential. **Environmental Sustainability**, v. 2, n. 3, p. 285–296, 2019.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249–256, 1996.

USMANI, Z. et al. Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 346, n. November 2021, p. 126444, 2022.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–6, 2015.

VATER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.

WANG, C. et al. Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for Promoting the Growth of *Malus hupehensis* Rehd. and Inhibiting *Fusarium verticillioides*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–16, 2020.

WEI, Y. H.; LAI, C. C.; CHANG, J. S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 40–45, 2007.

WHANG, L. M. et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 1, p. 155–163, 2008.

YONAR, T.; SIVRIOĞLU, Ö.; ÖZENGİN, N. Physico-Chemical Treatment of Dairy Industry Wastewaters: A Review. In: **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing**. [s.l.] InTech, 2018. v. 32p. 137–144.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339–347, 2004.