

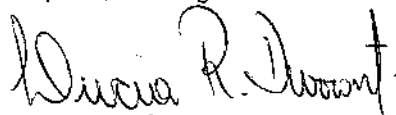
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS
PRODUTORES DE BIOEMULSIFICANTES A PARTIR
DE EFLUENTES DE INDÚSTRIA DE MARGARINA E
SABÃO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Eliane Maria Ferrarezzo aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de agosto de 1998.

Campinas, 25 de agosto de 1998.



Prof. Dra. LÚCIA R. DURRANT
Presidente da Banca

Eliane Maria Ferrarezzo
Engenheira de Alimentos - UNICAMP

Prof. Dra. Lúcia R. Durrant
Orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências de
Alimentos**

Campinas/SP
Agosto/98

382129

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	35462
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/10/98
N.º CPD	

CM-00117048-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F412i

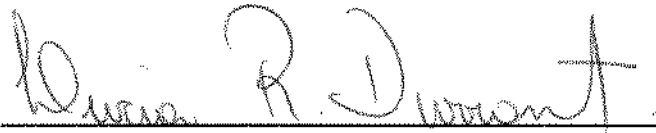
Ferrarezzo, Eliane Maria

Isolamento e seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão / Eliane Maria Ferrarezzo. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biosurfactantes. 2.Emulsões. 3.Bactérias.
4.Biodegradação. 5.Óleo. 6.Resíduos. I.Durrant, Lúcia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant - Orientadora



Profa. Dra. Hélia H. Sato - Membro



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - Membro

Prof. Dr. José Luiz Pereira - Membro suplente

EDUCAÇÃO INTEGRAL

“A importância da educação transcende ao que lhe tem sido atribuído, face ao imediatismo dos objetivos que os métodos aplicados perseguem.

A falta de estrutura moral do educador - isto é, o equilíbrio psicológico e afetivo, as noções de responsabilidade e dever, a abnegação em favor do aprendiz, a paciência para repetir a lição até impregnar o ouvinte, sem irritação nem reprimenda e amor - constitui fator adverso ao êxito do empreendimento que é a base da vida na construção do homem integral.

Quando se educa, são canalizados os valores latentes no indivíduo para o seu progresso, fornecendo os recursos que facultam a germinação dessas potências no cerne do ser. Educar é libertar com responsabilidade e consciência de atitude em relação ao educando, a si mesmo, ao próximo e à Humanidade.

Quando se reprime e se impõe condicionamentos pela violência, uma reação em cadeia provoca a inrupção da revolta que explode em atos de agressividade que asselvaja. A tarefa da educação é, sobretudo, de iluminação de consciência, mediante a informação e vivência do conhecimento que se transmite.

Quem educa evita a manifestação da delinquência e do desequilíbrio social, estabelecendo metas de promoção da vida.

A punição significa falência na área educativa.

A repressão representa insegurança educacional.

A reprovação demonstra fracasso metodológico.

O educando é material maleável, que aguarda modelagem própria para fixar os caracteres que conduzem à perfeição.

O educador cria hábitos, estimula atitudes, desenvolve aptidões, conduz. É guia hábil e gentil, ensinando sempre pela palavra e pelo exemplo, não se cansando nunca do ministério que abraça.

A escola é o prosseguimento do lar e este é a escola abençoada na qual se fixam valores condizentes com a dignidade e engrandecimento ético-moral do ser.

A educação é fenômeno presente em todas as épocas. O pajé que ensina, o guru que orienta, o mestre que transmite lições, são educadores diversos através dos tempos.

A verdadeira educação ocorre no íntimo do indivíduo, sendo um processo verdadeiramente transformador.

Qual semente que sai do fruto e semelhante à vida que esplende saindo da semente, quando os fatores são-lhe propícios, a educação é mecanismo semelhante da vida a serviço da vida. É certo que o homem se apresenta imperfeito, por enquanto, todavia é, potencialmente, perfeito e à educação compete o papel de o desenvolver. A divina semente que nele jaz, a educação põe a germinar.

Sempre se educa e se sai educado, quando se está atento e predisposto ao ensino e à aprendizagem. Todos somos educadores e educandos, conscientemente ou não. A educação porém, há de ser integral, do homem total.

Jesus, o Educador por Excelência, procegue, paciente, amando-nos e educando-nos, havendo apenas aceito o título de Mestre, porque, em verdade O é.”

(Momentos de Meditação - Divaldo P. Santos e Joana de Ângelis)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus pelo amor, pela vida, pela família e amigos que me proporcionou.

Aos meus pais, Décio e Tereza, aos meus irmãos Adriano, Andréia e Marcos, por todo o ensinamento, amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

AMIGO

É aquele que passa o sábado à noite ajudando a tirar fotos de tubos de ensaio e que gasta horas editando as fotos. É aquele que tem a "paciência de Jó" para explicar uma metodologia ou reação química, tirar uma dúvida e ainda ter a sensibilidade de não te fazer sentir burro. É aquele que consegue rir das piadas infames que você insiste em contar. Que te empresta roupa para fazer entrevista para emprego. São aqueles que fazem um "chá de cozinha" quando você vai sair da cidade para um novo emprego e não um centavo nem para comprar garfo. São aqueles que vão no "bar da coxinha" para comemorar tudo de bom que te acontece. Também é aquele de quatro patas sempre abanando o rabo que te lambe quando você teve um dia de "cão". É aquele que enxuga as suas lágrimas quando se leva um fora do namorado, que ouve pela enésima vez a mesma estória. É aquele que gasta interurbano internacional só pra falar "oi". É aquele que quando você perde o emprego te leva para um praia paradisíaca pra te lembrar que a vida é linda. É aquele que se oferece para pagar as encadernações da tese quando você está desempregado e em sem bolsa. É aquele que lê e corrige o boneco da tese com a maior paciência e carinho gastando horas para que o trabalho fique melhor. É aquele que te sorri quando você está triste, mau humorado e transforma o dia de tempestade num dia ensolarado com arco-íris.

MUITO OBRIGADO MEUS AMIGOS:

Ana Lúcia, Anna Cecília, Antonio, Argentina, Carmem, Cida, Contado, Dircinha, Edilsa, Fabíola (PE), Gustavo (AR), Ila, Ingrid, Yinn, Janice, Liana, Lilian Luciana, Marcolino, Marta, Massa, Mirian, Mônica, Mônica Raineri, Patrícia, Priscila, Regina, Ricardo, Roseli, Rosinha, Sandra, Sandra (PE), Susy, Valéria, Vitor, Yog e tantos outros que participaram da minha vida.

Eli.

AGRADECIMENTOS

- À CAPES pela bolsa de estudos.
- À Gessy Lever - Divisão Van Der Berg em especial ao Sr. Nivaldo Rovere pelo fornecimento das amostras, análises de DQO e toda a colaboração prestada durante a realização deste trabalho.
- À Profa. Dra. Lucia Regina Durrant pela orientação.
- Aos professores Ranulfo Monte Alegre, Hélia H. Sato e José Luiz Pereira pela colaboração, por todas as sugestões e críticas que em muito contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.
- À Profa. Dra. Hélia H. Sato pelos mais de 10 anos de valiosos ensinamentos acadêmicos e profissionais, que pelo seu exemplo de vida, profissionalismo, dedicação e amor à Ciência fizeram de mim um profissional e um ser humano melhor.
- À Comissão de Pós-Graduação da FEA e à Sub-Comissão de Pós-Graduação do Depto. de Ciências em especial ao Prof. Horácio e Profa. Helena Godoy pelo profissionalismo, coerência, boa vontade e respeito ao pós-graduando, sem os quais esta defesa de tese não teria sido possível.
- À Profa. Dra. Mirian T. Santos por toda ajuda, apoio e amizade que sem os quais não teria sido possível concluir este trabalho.
- À Cristine Fior dos Santos pela disponibilização e treinamento no uso do Tensiômetro e pelo companheirismo.
- À todos os professores da FEA que contribuíram para a minha formação.
- Aos funcionários do Laboratório de Sistemática por toda a colaboração prestada.
- Aos funcionários da secretaria do Depto. de Ciências em especial ao Marquinhos e Marcão pela paciência, apoio e amizade.
- Aos funcionários da Biblioteca e do Microcentro pela boa vontade e colaboração.
- À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- À aqueles que colocaram “pedras” no meu caminho pois me tornaram um ser mais forte, humilde e perseverante.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DAS TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

SUMÁRIO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Emulsões, emulsificantes e bioemulsificantes.....	2
2.2 Produção de bioemulsificantes.....	6
2.2.1 Bioemulsificantes produzidos por bactérias.....	7
2.2.2 Produção de bioemulsificantes por leveduras.....	10
2.2.3 Produção de bioemulsificantes por fungos filamentosos.....	12
2.3 Uso dos bioemulsificantes.....	13
2.3.1 Uso de bioemulsificantes em biorremediação.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1- Material.....	18
3.1.1- Equipamentos.....	18
3.1.2- Reagentes.....	18
3.1.3 - Meios de cultura.....	19
3.2 - Métodos.....	20
3.2.1- Obtenção de microrganismos produtores de bioemulsificantes.....	20
3.2.1.1 Coleta de amostras	20
3.2.1.2 Isolamento, purificação e preservação.....	22
3.2.3 Determinação da capacidade de produção de bioemulsificantes dos microrganismos.....	23
3.2.3.1- Condições de cultivo.....	23
3.2.3.2 -Determinação do Índice de Emulsão.....	23
3.2.4 Seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes.....	25
3.2.5 Produção de bioemulsificante em diferentes valores de pH e tempos de cultivo.....	26

3.2.6 Determinação da Tensão Superficial.....	26
3.2.7 Determinação da biomassa.....	27
3.2.8 Determinação da redução da DQO pelo cultivo em efluente.....	27
3.2.9 Verificação da atividade hemolítica.....	28
3.2.10 Identificação dos microrganismos produtores de bioemulsificantes.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1 Microrganismos isolados de efluentes.....	30
4.2 Microrganismos produtores de bioemulsificantes selecionados.....	31
4.3 Influência do pH do meio de cultivo na redução da tensão superficial	40
4.4 Influência do pH do meio de cultivo na produção da biomassa.....	41
4.5 Efeito do pH do meio de cultura no Índice de Emulsificação da emulsão de óleo de soja, querosene, tolueno, xileno e óleo diesel em sobrenadante das culturas B1 e B9.....	44
4.6 Comparação entre o número de Gotas Emulsionadas (GE) e o Índice de Emulsificação	52
4.7 Atividade hemolítica das linhagens B1 e B9.....	55
4.8 Redução da DQO do efluente EF2 proveniente da indústria de margarina pelas linhagens B1 e B9.....	55
4.9 Identificação do gênero das linhagens B1 e B9.....	57
5. CONCLUSÕES.....	58
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
 APÊNDICES	
APÊNDICE A.....	66
APÊNDICE B.....	69
APÊNDICE C.....	82
APÊNDICE D.....	83

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 1	Dispersões em alimentos.....	2
TABELA 2	Tipos de emulsões em alimentos.....	3
TABELA 3	Bioemulsificantes produzidos por microrganismos.....	5
TABELA 4	Porcentagem dos microrganismos isolados de efluentes de indústria de margarina e sabão.....	31
TABELA 5	Determinação do Índice de Emulsão (E24), absorbância (540nm) e Gotas Emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes de fábrica de sabão (EF1) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C fermentados por bactérias e leveduras por 48 horas	32
TABELA 6	Determinação do Índice de Emulsão (E24), absorbância (540nm) e Gotas Emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes de fábrica de margarina (EF2) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C fermentados por bactérias e leveduras por 48 horas.....	33
TABELA 7	Determinação do Índice de Emulsão (E24), absorbância (540nm) e Gotas Emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes do tanque de mistura (EF3) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C fermentados por bactérias e leveduras por 48 horas.....	34
TABELA 8	Determinação do Índice de Emulsão (E24), absorbância (540nm) e Gotas Emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes do tanque de “Fat Trap” (EF4) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C fermentados por bactérias e leveduras por 48 horas.....	35
TABELA 9	Determinação do Índice de Emulsão (E24), absorbância (540nm) e Gotas Emulsionadas (GE) de óleo de soja em água estabilizadas pelos sobrenadantes dos efluentes EF1, EF2, EF3 e EF4 fermentados por fungos filamentosos à 30°C por 120 horas.....	36
TABELA 10	Índice de Emulsão (E24), absorbância (540nm) e Gotas Emulsionadas (GE) da emulsão de óleo de soja em água estabilizadas pelos sobrenadantes dos meios de cultivo GYP e OS 3% fermentados por bactérias e leveduras à 30°C por 48 horas... 	37
TABELA 11	Índice de Emulsificação do sobrenadante das culturas das linhagens D14, B1 e B9 em relação a: óleo de soja, querosene, tolueno, vaselina e xileno.....	39
TABELA 12	Efeito do pH do meio GYP na produção de massa seca pela linhagem B1.....	42

TABELA 13 Efeito do pH do meio GYP na produção de massa seca pela linhagem B9.....	42
TABELA 14 Início da formação da emulsão máxima (GE++++) das linhagens B1 e B9 cultivadas em meio GYP em pH 5,0, pH 7,0 e pH 11,0 em relação aos compostos testados41.....	51
TABELA 15 Redução da DQO do efluente EF2 pela linhagem B9.....	56
TABELA 16 Características morfofisiológicas das linhagens B1 e B9.....	57
APÊNDICE	
APÊNDICE A.....	66
TABELA A1 Condições de isolamento, morfologia e coloração de Gram das bactérias isoladas do efluente de EF1.....	66
TABELA A2 Condições de isolamento, morfologia e coloração de Gram das bactérias isoladas do efluente EF2.....	66
TABELA A3 Condições de isolamento, morfologia e coloração de gram das bactérias isoladas do efluente EF3 e EF4.....	67
TABELA A4 Condições de isolamento dos fungos filamentosos e leveduras isolados dos efluentes EF1, EF2, EF3 e EF4.....	68
APÊNDICE B.....	69
TABELA B1 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D29 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	69
TABELA B2 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem B4 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	70
TABELA B3 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D30 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	71
TABELA B4 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D20 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	72

TABELA B5 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D13 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	73
TABELA B6 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D19 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	74
TABELA B7 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem B12 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno	75
TABELA B8 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem A26 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	76
TABELA B9 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D14 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	77
TABELA B10 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D3 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	78
TABELA B11 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D11 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	79
TABELA B12 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem B1 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	80
TABELA B13 Índice de emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem B9 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno.....	81
 APÊNDICE C	
TABELAC1 Influência do pH do meio GYP na produção de bioemulsificante pela linhagem B1 na redução da tensão superficial (TS-mN/m).....	82

TABELA C2 Influência do pH do meio GYP na produção de bioemulsificante pela linhagem B9 na redução da tensão superficial (TS-mN/m).....	82
---	----

APÊNDICE D

TABELA D1 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a óleo de soja quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	83
TABELA D2 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a querosene quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	83
TABELA D3 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a tolueno quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	84
TABELA D4 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a óleo diesel quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	84
TABELA D5 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a xileno quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	85
TABELA D6 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a óleo de soja quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	86
TABELA D7 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a querosene quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	86
TABELA D8 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a tolueno quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	87
TABELA D9 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a óleo diesel quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	87
TABELA D10 Índice de Emulsificação (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a xileno quando cultivada em meio GYP com diferentes valores de pH.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama esquemático da estação de tratamento de efluentes....	21
Figura 2	Esquema de enriquecimento das amostras de efluente.....	23
Figura 3	Medida do índice de emulsão.....	24
Figura 4	Numero de gotas emulsionadas (GE) de acordo com escala de intensidade: +, ++, +++, ++++ e T (exemplo de coluna emulsionada turva).....	25
Figura 5	Efeito do pH no meio GYP na produção de massa seca pela linhagem B1.....	43
Figura 6	Efeito do pH no meio GYP na produção de massa seca pela linhagem B9.....	43
Figura 7	Índice de emulsificação de óleo de soja em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial.....	45
Figura 8	Índice de emulsificação de querosene em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial.....	45
Figura 9	Índice de emulsificação de tolueno em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores pH inicial.....	46
Figura 10	Índice de emulsificação de óleo diesel do sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores pH inicial.....	46
Figura 11	Índice de emulsificação de xileno em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores pH inicial.....	47
Figura 12	Índice de emulsificação de óleo de soja em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial.....	48
Figura 13	Índice de emulsificação de querosene em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial.....	48
Figura 14	Índice de emulsificação de tolueno em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores pH inicial.....	49

Figura 15	Índice de emulsificação de óleo diesel do sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores pH inicial.....	49
Figura 16	Índice de emulsificação de xileno em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores pH inicial.....	50
Figura 17	Escala do número de Gotas Emulsionadas (GE): +, ++, +++, ++++ e coluna emulsionada turva (T).....	54
Figura 18	Óleo de soja emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h.....	54
Figura 19	Querosene emulsionada pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h.....	54
Figura 20	Tolueno emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h.....	54
Figura 21	Óleo diesel emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h.....	54
Figura 22	Xileno emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h.....	54

SUMÁRIO

O interesse por microrganismos produtores de bioemulsificantes tem crescido nas últimas décadas pelo seu potencial de aplicação na indústria de alimentos, agrícola, farmacêutica e petroquímica assim como em biorremediação, devido as suas características de biodegradabilidade, não toxicidade e pela possibilidade de produção a partir de substratos renováveis. Bactérias, fungos filamentosos e leveduras com capacidade de produzir bioemulsificantes tem sido isolados de várias fontes de carbono como hidrocarbonetos, açúcares, óleos vegetais e resíduos industriais.

Foram isoladas 111 linhagens de microrganismos a partir de efluente de indústria de margarina e sabão, sendo estas linhagens testadas quanto a capacidade de produzir bioemulsificante.

Dentre estes microrganismos as linhagens B1 e B9, identificadas como *Bacillus sp*, apresentaram os melhores valores de emulsificação. Foi estudada a produção de bioemulsificante em função da fonte de carbono (óleo de soja e glicose) e pH do meio de cultivo (pH 5,0, 7,0 e 11,0) bem como sua capacidade de emulsionar compostos aromáticos (tolueno e xileno) e misturas de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos (querosene e óleo diesel) além de triglicerídeos (óleo de soja).

Os melhores Índices de Emulsificação ocorreram quando as linhagens B1 e B9 foram cultivadas em meio GYP (glicose, extrato de levedura, peptona,) em pH 7,0 após 10 horas de cultivo em relação a óleo de soja (43,39%), querosene (44,00%), tolueno (40,42%), óleo diesel (44,85%) e xileno (45,00%). Estas linhagens provocaram pequena diminuição da tensão superficial dos meios de cultivo.

Os *Bacillus sp* B1 e *Bacillus sp* B2 produziram bioemulsificantes capazes de emulsionar óleo de soja, querosene, tolueno, óleo diesel e xileno apresentando potencial de aplicação em biorremediação.

SUMMARY

The interest for microorganisms able to produce bioemulsifiers is growing in last decade by their potencial application in food, pharmaceutical, agriculture, petrolium industries as so as biorremediation application because the bioemulsifiers are biodegradable, non toxic and they can be produced from renovable substracts. Many bacterias, yeasts and molds have been isolated to produce bioemulsifiers from sugars, hidrocarbon, vegetable oils and industrial wastes.

One hundred eleven strains of microorganisms isolated from wastewater of margarine and soap industry at Campinas region - São Paulo were studied in relation to their bioemulsier production capacity.

Two strains of that the strains B1 and B9 identified *Bacillus sp* showed best bioemulsifier activity. The influence of various factors were studied such as: pH (5.0 , 7.0 and 11.0), carbon souce (soya bean oil and glucose) and the bioemulsifier activity against aromatic compounds (toluene and xilene) and mixtures of hidrocarbons (kerosen and diesel oil) and tryglicerides (soya bean oil) were tested.

In the study of bioemulsifier activity the *Bacillus sp* B1 and *Bacillus sp* B2 had the best when were growing in GYP medium (glucose, yeast extract, pepetone) was used in pH adjusted to 7.0 at 10 hours related to soy bean oil (43,39%), kerosen (44,00%), toluen (40,42%), diesel oil (44,85%) and xilene (45,00%). There was not significative superficial tension decrease.

The strains *Bacillus sp* B1 and *Bacillus sp* B9 were able to emulsify soya bean oil, kerosen, toluene, diesel oil and xilene. It is showing a potential application in biorremediation.

1. INTRODUÇÃO

Os emulsificantes são compostos de superfície ativa com ampla aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, farmacêutica, química e petroquímica. A demanda por emulsificantes é grande e com alto valor de mercado. A maioria dos emulsificantes são sintetizados quimicamente tendo o petróleo como matéria prima, tornando a produção e uso dos emulsificantes sintéticos um problema ambiental, pois são altamente tóxicos e de difícil biodegradação.

Nas ultimas décadas o interesse por emulsificantes produzidos por microrganismos, os bioemulsificantes, têm crescido devido ao fato destes microrganismos produzirem emulsificantes biodegradáveis e não tóxicos, além da possibilidade de se utilizar matérias primas renováveis como óleos vegetais, açúcares, resíduos industriais dentre outros.

Os bioemulsificantes têm grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, de cosméticos, farmacêutica e agrícola, porém têm sido reportados com maior ênfase na aplicação em indústrias petroquímicas e em biorremediação com o objetivo de aumentar o rendimento da extração de petróleo, promover a limpeza de tanques de petróleo, para remoção de petróleo e seus derivados contaminantes do meio ambiente e remoção de metais pesados contaminantes do solo.

A produção de bioemulsificantes não é economicamente competitiva, quando comparada à produção de emulsificantes sintetizados quimicamente, devido ao seu alto custo de produção, à metodologia de bioprocessamento empregada e baixo rendimento das linhagens de microrganismos utilizadas e do alto custo dos hidrocarbonetos. A busca por microrganismos capazes de produzir bioemulsificantes com alto rendimento a partir de substratos renováveis e de baixo custo são importantes parâmetros a serem estudados para a viabilização da produção dos bioemulsificantes.

O presente trabalho teve como objetivo o uso de efluentes de fábrica de margarina e sabão para isolar e selecionar cepas produtoras de bioemulsificantes; verificar a capacidade de produção de bioemulsificantes pelas cepas selecionadas a partir do cultivo nos meios de cultura GYP (glicose, ext. levedura, peptona) e OS (óleo de soja e sais) com diferentes valores de pH e medir o índice de emulsificação em relação a: óleo de soja, querosene, óleo diesel, tolueno, vaselina e xileno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMULSÕES, EMULSIFICANTES E BIOEMULSIFICANTES

Uma emulsão é um sistema coloidal disperso, no qual as fases são líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis e os glóbulos do líquido disperso apresentam, geralmente, diâmetros entre 0.1 μm e 10 μm . As dispersões coloidais são amplamente utilizados em alimentos conforme apresentado na Tabela 1.

Em quase todas as emulsões uma das fases é água e a outra é um líquido não miscível aqui chamados de óleo. Se o óleo for a fase dispersa, a emulsão é chamada emulsão óleo em água (O/A); se o meio aquoso for a fase dispersa, é chamada de emulsão de água em óleo (A/O) (SHAW, 1975). Na Tabela 2 são apresentados exemplos dos tipos de emulsão que ocorrem em alimentos.

TABELA1 - Dispersões em Alimentos

Fase Dispersa	Fase Dispersante	Classificação	Exemplo
Sólido	Líquido	Sol	Solução de Pectina
Líquido	Líquido	Emulsão	Maionese
Gás	Líquido	Espuma	Clara de Ovo Batida
Gás	Sólido	Espuma Sólida	Sorvete

Fonte: BOBBIO & BOBBIO, 1992

TABELA 2 - TIPOS DE EMULSÕES EM ALIMENTOS

Alimento	Tipo	Estabilizadas por
Leite	O/A	Fosfolípídeos
Creme de leite	A/O	Fosfolípídeos, proteínas e emulsionantes sintéticos
Maionese	A/O	Proteínas, fosfolípídeos, e polissacarídeos
Sorvete	O/A	Proteínas, fosfolípídeos e polissacarídeos

Fonte: BOBBIO&BOBBIO, 1992.

A propriedade mais importante de uma emulsão é a sua estabilidade. Esta estabilidade depende de vários fatores como: diferença de densidade entre as fases, viscosidade do sistema, dimensões do dispersóide, relação entre os volumes das fases, existência e valor das cargas elétricas, presença de substâncias tensoativas e da tensão superficial. (BOBBIO & BOBBIO, 1992; SHAW, 1975)

As substâncias tensoativas são compostos anfipáticos, isto é, têm em sua molécula uma parte muito grande apolar de natureza de hidrocarboneto, solúvel em óleo e uma extremidade polar, solúvel em água. Estas substâncias são capazes de se solubilizar tanto em água quanto em óleo. A sua solubilidade em óleo é conferida pela cadeia carbônica enquanto que o grupo polar, por sua afinidade em água, é capaz de arrastar consigo uma cadeia carbônica não muito longa e constituir uma solução aquosa. Quando estas substâncias são colocadas em meio óleo-água ou água-ar elas se orientam de modo a manter os grupos hidrofílicos na fase aquosa e as cadeias carbônicas na fase oleosa ou ar (MORRISON & BOYD ,1983).

O comportamento destas substâncias, que se adsorvem fortemente na superfície de líquidos ou na interface de separação entre dois líquidos imiscíveis formando monocamadas moleculares orientadas, é denominado atividade superficial. O abaixamento da tensão superficial de um sistema prossegue com o aumento da concentração da substância tensoativa até que, a partir de uma determinada concentração não há alteração da tensão superficial. Esta concentração da substância tensoativa é conhecida como concentração crítica de micela (c.m.c.). O aumento da concentração acima da c.m.c. não produz alteração da tensão superficial do sistema. Isto sugere a ocorrência de associação entre as partículas (SHAW, 1975).

BOBBIO & BOBBIO (1992) denominam emulsionantes as substâncias tensoativas e SHAW (1975) as denomina como agentes emulsionantes, porém na regulamentação de aditivos para alimentos a legislação brasileira é utilizado o termo estabilizante para indicar compostos que estabilizam emulsões, não sendo utilizados os termos emulsificantes ou agentes emulsionantes.

Na literatura referente à produção de substâncias tenso ativas por microrganismos, os termos surfactante e emulsificante têm sido freqüentemente mencionados com o mesmo significado para indicar compostos que estabilizam emulsões. No entanto, FIECHTER (1992) e GUTNICK & SHABTAI. (1987) descreveram o termo surfactante para compostos que possuem na mesma molécula estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo o termo biosurfactante foi descrito para a molécula de superfície ativa produzida, em geral, extracelularmente por microrganismos. O termo bioemulsificante foi usado como a combinação de todos os compostos de superfície ativa e são liberados por microrganismos. No presente trabalho utilizaremos o termo bioemulsificante com esta mesma definição.

A propriedade mais freqüente dos bioemulsificantes em solução aquosa é a redução da tensão superficial, assim o uso de bioemulsificante reduz a tensão superficial da água pura que é de 72 mN/m até 20 mN/m à 25°C.

Por terem características hidrofílicas e hidrofóbicas, os bioemulsificantes ficam acumulados na interface formando micelas, mediando as fases de diferentes polaridades como óleo-água, ar-água ou água-sólido. A dinâmica do processo de emulsificação é baseada na habilidade de reduzir a tensão superficial através do arranjo das moléculas hidrofílicas, influenciando na formação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

A maioria dos bioemulsificantes são aniônicos ou neutros, não havendo registros de bioemulsificantes catiônicos na literatura. Os bioemulsificantes são classificados de acordo com as características da parte hidrofílica de suas moléculas, como: ácidos graxos, glicolipídeos, lipopolissacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos (GERSON, *et al.*, 1979; KOSARIC *et al.*, 1987; HOMMEL, 1990; VAN DYKE *et al.*, 1991; FIECHTER, 1992).

Vários bioemulsificantes são produzidos por bactérias, fungos e leveduras, em geral, isolados de solos e águas contaminados com hidrocarbonetos, sendo os glicolipídeos os mais produzidos. Alguns exemplos de microrganismos produtores e seus respectivos bioemulsificantes são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3 - BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

COMPONENTES	PROPRIEDADES	MICRORGANISMOS
Celobioselipídeo	Glicolipídeo, aniônico	<i>Ustilago maydis</i> , <i>Ustilago zeae</i>
Manosileritritol lipídeo	Glicolipídeo, não iônico	<i>Candida sp</i>
Ramnolipídeos	Glicolipídeo, aniônico,	<i>Pseudomonas sp</i>
Soforolipídeo	Glicolipídeo, não iônico ou aniônico,	<i>Torulopsis sp</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
"Emulsan"	lipoheterossacarídeo, polianiônico	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
"Surfactina", "subtilisina"	Lipopeptídeo, extracelular	<i>Bacillus subtilis</i>
Peptidoglicolipídeo	Extracelular	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fonte: KOSARICK, *et al.*, 1987

2.2 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES

Nos últimos anos, o interesse por compostos de superfície ativa têm crescido significativamente. A demanda industrial de emulsificantes é grande sendo que o mercado de sabões e detergentes movimentou 12,8 trilhões de dólares em 1990. Espera-se que até o ano 2000 haja um aumento de 35% da produção atual de surfactantes para atender uma demanda crescente (FIECHTER, 1992).

Devido a enorme demanda, grandes quantidades destes surfactantes sintéticos têm se depositado no ecossistema através da descarga de resíduos aquosos ou pela aplicação direta. Os surfactantes sintéticos são potencialmente perigosos ao meio ambiente, sendo tóxicos para algas, peixes e bactérias em concentrações de 1 mg/l.

O estudo de emulsificantes produzidos por microrganismos (bioemulsificantes) têm despertado muito interesse, porque estes freqüentemente possuem algumas propriedades superiores aos surfactantes sintéticos o que inclui baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade e um grande número de estruturas.

Têm sido usados hidrocarbonetos para a produção de bioemulsificantes, o que resulta em dificuldades de processamento por serem compostos não miscíveis com água, sendo necessária a utilização de equipamentos especiais com um baixo rendimento de produção. Estes fatores tornam o bioemulsificante um produto de alto custo.

O primeiro bioemulsificante produzido comercialmente a partir de hidrocarbonetos foi o "Emulsan" pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012). O "Emulsan" é um heteropolissacarídeo polianiónico com peso molecular de $9,8 \times 10^5$ D, sendo os seus polissacarídeos constituídos por três amino-açúcares: D-galactosamina, ácido D-galactosamina urônico e um terceiro não identificado.

Os bioemulsificantes também podem ser produzidos a partir substratos renováveis como óleos vegetais, carboidratos e até resíduos industriais. Muitos fatores influenciam a produção de bioemulsificantes tais como a natureza da fonte de carbono, limitações nutricionais, temperatura, aeração e o tipo de microrganismo

utilizado (GERSON & ZAJIC, 1979; GUTNICK & SHABTAI, 1987; KOSARICK *et al.*, 1987; FIECHTER, 1992; GINKEL, 1996; SKIPINA *et al.*, 1998).

Geralmente, os hidrocarbonetos induzem a síntese de bioemulsificante, porém a presença deste substrato não é um pré-requisito para todos os microrganismos. Os microrganismos podem crescer e produzir bioemulsificantes tanto em meio contendo substratos insolúveis quanto solúveis. Dependendo do substrato utilizado, freqüentemente observa-se que a estrutura do bioemulsificante formado é alterada (SYLDATK *et al.*, 1987; CARRILLO *et al.*, 1996).

2.2.1 BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS

Dentre os bioemulsificantes produzidos por bactérias a partir de n-alcanos, carboidratos e meios complexos, os glicolípídeos e os lipopeptídeos são os mais conhecidos (LANG & WAGNER, 1987).

Várias espécies de *Pseudomonas* têm sido reportadas como sendo capazes de produzir ramnolípídeos. A bactéria *Pseudomonas fluorescens* é um microrganismo capaz de produzir bioemulsificante a partir de glicose e seu bioemulsificante foi identificado como sendo um lipopeptídeo denominado "Viscosin", encontrado também na espécie *Pseudomonas viscosa* (LAYCOCK *et al.* 1991).

A partir de meios de cultura contendo xileno e querosene como fontes de carbono uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de produzir bioemulsificantes. A atividade do bioemulsificante foi medida em relação a capacidade de emulsionar querosene e chegou a 62% de emulsão quando a bactéria foi cultivada em meio contendo querosene, porém demonstrou uma pequena redução de tensão superficial de 13mN/m e quando cultivada em meio contendo xileno a redução da tensão superficial foi de apenas 8mN/m. (COOPER, *et al.*, 1981a).

Outra linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DSM2659 foi capaz de produzir bioemulsificante, porém a partir de glicose em processo contínuo. Neste estudo

GUERRA-SANTOS (1984) obteve melhor eficiência com o uso de: nitrato como fonte de nitrogênio e relação de C:N de 18; íon ferro (27,5 µg de sulfato de ferro/g de glicose) e a relação C:P de 16. Para 18,2g de glicose/l obteve-se 1.5 g de ramnolípido/l de meio livre de células.

Uma outra linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* UG2 foi estudada por VAN DYKE *et al.* (1993), apresentando também produção de bioemulsificantes a partir de glicose. Estes foram identificados como dois diferentes ramnolípidos: alfa-L-ramnopiranosil-beta-hidroxidecanoil-beta-hidroxidecanoato 2-o-alfa-L-ramnopiranosil-alfa-L-raminopiranosil-beta-hidroxidecanoil-beta-hidroxidecanoato. Eles foram comparados a emulsificantes sintéticos quanto a capacidade de remover fenantreno do solo, sendo que o primeiro ramnolípido removeu 29% de fenantreno, o segundo removeu 46% e o emulsificante sintético SDS (sódio dodecil sulfato) removeu apenas 3%.

Já nos estudos realizados por ZHANG & MILLER (1995) uma outra linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) produziu também ramnolípidos, porém a partir do uso de hexadecano como fonte de carbono. Os dois ramnolípidos apresentaram-se sob a forma de metil ester (dR-Me) e na forma ácida (dR-A). Estes mostraram ter propriedades diferentes em relação a tensão superficial, sendo que a forma dR-Me diminuiu a tensão superficial da água de 72mN/m para menos de 0,1mN/m enquanto que a forma dR-A diminuiu para 5mN/m.

Um glicolípido contendo também ramnose foi reportado por BABU, *et al.* (1996) quando uma outra linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* BS2, produtora de glicolípido foi capaz de produzir bioemulsificante a partir de resíduos industriais de destilaria de uísque e soro de leite. Comparando-se a produção de bioemulsificante a partir de resíduos e a partir de meio sintético contendo glicose, constatou-se maior produção de bioemulsificante quando usados os resíduos industriais.

Também a partir de resíduos industriais MERCADE & MANRESA (1994) relataram a produção de um ramnolípido por outra linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, onde resíduo industrial da produção de óleo de oliva foi utilizado. O bioemulsificante produzido apresentou um potencial de redução da tensão superficial de 50 para 30 mN/m.

Vários *Bacillus sp* têm sido reportados como produtores de lipopeptídeo. COOPER (1981b) estudou o lipopeptídeo "Surfactina" (que têm na sua molécula sete peptídeos na sequência LGlu-Lleu-Dleu-Lval-Lasp-Dleu-Lleu ligados ao

betahidroxi ácido graxo nos carbonos 13, 14 e 15), produzido por *Bacillus subtilis*, utilizando glicose como fonte de carbono, quando cultivado em fermentador contínuo a 30°C/200rpm e aeração. A extração da "Surfactina" foi feita pelo tratamento ácido da espuma formada durante a fermentação. A adição de ferro e manganês ao meio de cultura após 62 h aumentou exponencialmente a produção de "Surfactina" e a biomassa do *Bacillus subtilis*. A adição de hexadecano ao meio inibiu totalmente a produção de "Surfactina". A tensão superficial da água foi reduzida para 27mN/m com uma concentração de 0,8g/l de "Surfactina".

Uma outra linhagem de *Bacillus subtilis* (S499) foi estudada por PEYPOUX (1994), produziu uma mistura de "Surfactinas" quando cultivada em meio contendo L-alanina como fonte de nitrogênio. Estas "Surfactinas" foram isoladas e identificadas por estes autores apresentando uma seqüência de peptídeos que diferem da "Surfactina" padrão pela substituição de L-valina por L-alanina na posição 4, sendo denominadas "[Ala4] Surfactina".

Várias linhagens de *Bacillus licheniformis* também têm sido reportadas como produtoras de lipopeptídeos. LIN *et al.* (1994) estudou a produção de bioemulsificantes a partir de glicose como fonte de carbono pela linhagem de *Bacillus licheniformis* JF-2, tanto aerobicamente quanto anaerobicamente. Nas condições ótimas (42°C/pH 6,0/15 h) apresentou uma c.m.c de 0,01g/l e redução da tensão interfacial contra hexadecano de 0,006 mN/m quando na concentração de 0,05g/l. Esta redução da tensão interfacial foi considerada a maior já reportada sobre um microrganismo produtor de bioemulsificante. O bioemulsificante produzido foi identificado como um lipopeptídeo com peso molecular de 1.035 Da, tendo um ácido graxo de 15 carbonos ligado a um peptídeo muito similar a "Surfactina" produzida por *Bacillus subtilis*.

Outra linhagem denominada *Bacillus licheniformis* 86 também foi reportada por HOROWITZ *et al.* (1990) por produzir bioemulsificante a partir de glicose. Este bioemulsificante foi extraído do meio de cultivo com metano e denominado de BL86, sendo classificado como aniônico, capaz de diminuir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, atingir uma c.m.c. com 10µg de surfactante/ml e tensão interfacial contra n-hexadecano foi de 0,36mN/m. Este lipopeptídeo foi estável à variações de pH entre 4 e 13 e às temperaturas de 25 a 120°C.

Um composto de superfície ativa produzido por uma outra linhagem de *Bacillus licheniformis* também a partir de glicose como fonte de carbono, foi

estudado por JENNY, *et al.* (1991) que identificaram neste bioemulsificante uma estrutura com traços de ácidos graxos saturados como palmítico e esteárico, com uma pequena quantidade de hidrocarbonetos de 20-22 carbonos e os peptídeos constituídos por Glu, Asp, Val, três Leu e uma Ileu. Com uma concentração de 0,015g/l este bioemulsificante reduziu a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m

A bactéria *Acinetobacter radioresistens* KA53 também produz bioemulsificante, denominado "Alasan", porém a partir de etanol como fonte de carbono. Este foi extraído por precipitação com sulfato de amônia e identificado como um complexo de alto peso molecular da mistura de heteropolissacarídeos e proteína. A máxima atividade de emulsificação ocorreu a pH 5,0 na concentração de 4g de "Alasan"/l, sendo que uma grande variedade de emulsões óleo em água também foram estabilizadas incluindo alcanos, parafina, óleo de soja e óleo de côco (NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995).

A partir de hexadecano como fonte de carbono, o *Arthrobacter paraffineus* (ATCC 19558) apresentou atividade de emulsão, porém quando foi adicionado glicose ao meio houve uma diminuição de 21% na produção do bioemulsificante (DUVNJAK, 1982). Uma outra linhagem de *Arthrobacter paraffineus* (ATCC 15591) foi inoculado em meio contendo 1% de hexadecano com baixo rendimento de produção (1,2g/l). A atividade de emulsificação foi testada em relação a vários compostos aromaticos incluindo tolueno e xileno (SINGH & DESAI, 1988).

2.2.2 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR LEVEDURAS

As leveduras em geral produzem bioemulsificantes que contém em sua estrutura peptídeos. A manoproteína componente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada por CAMERON *et al.* (1988), onde pela extração de manoproteína por dois métodos, autoclavagem em tampão citrato neutro e a digestão com zimolase (beta 1,3 glucanase) apresentaram bom rendimento. O produto da extração a quente foi purificado por ultrafiltração e foi encontrado 44% de manose e 17 % de proteína, apresentou peso molecular de

aproximadamente 10.000 Da. O tratamento com enzima eliminou a capacidade de emulsificação do extrato. Emulsões com querosene foram estabilizadas com a manoproteína em variação de pH de 2,0 a 11,0 e os máximos valores de atividade, 95 e 97%, foram obtidos quando utilizou-se a massa celular residual do processo de fabricação de cerveja e vinho respectivamente, para a extração de manoproteína. Estes resíduos industriais podem ser utilizados para produzir este bioemulsificante que provavelmente não é tóxico, pois a *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada para a produção de vários tipos de alimentos.

Uma linhagem de *Torulopsis apícola* (IMET 43747) foi estudada por HOMMEL, *et al.* (1987). Estes autores descreveram que esta levedura foi capaz de produzir bioemulsificantes solúveis em água capazes de baixar a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m, cuja produção foi possível tanto utilizando glicose quanto n-hexadecano como fonte de carbono. A tensão superficial foi reduzida a 30mN/m logo após o início do crescimento (após 2 dias) em meio contendo glicose com pequena produção do bioemulsificante. A produção do bioemulsificante a partir de n-hexadecano iniciou-se na metade da fase exponencial, (após 7 dias) sendo a tensão superficial reduzida a 20 mN/m com maior produção do bioemulsificante. Foram produzidos de seis a nove diferentes glicolípideos denominados soforosídeos hidrofóbicos, que apresentaram propriedades antibióticas sobre microrganismos gram negativos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* e outros.

Uma outra levedura *Candida antarctica* utilizando óleos vegetais tais como óleo de soja, óleo de girassol, óleo de algodão, óleo de milho e óleo de palma produziu uma mistura de 4 manosileritritol lipídeo (MEL) (KITAMOTO *et al.*, 1990). Foi obtido maior rendimento (0,034g de MEL/ml) quando foi utilizado óleo de soja (80ml/l) como fonte de carbono com 0,2% de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, incubada à 30°C foi reportada por Estes mesmos autores não obtiveram produção de bioemulsificante a partir de glicose como fonte de carbono.

Uma outra linhagem a *Candida apícola* (estado anamórfico de *Torulopsis apícola*) foi reportada por HOMMEL & HUSE (1993), produziu grande quantidade de glicolípideo (soforose lipídeo) durante a fase estacionária a partir de glicose, frutose e sacarose, porém não foi capaz de produzir glicolípideos a partir de maltose ou galactose.

A levedura *Rhodoturula glutinis* linhagem IIP-30 foi capaz de produzir bioemulsificante extracelularmente utilizando glicose como fonte de carbono a pH

4,0 e 30°C, cujo índice de emulsificação máximo ocorreu durante a fase exponencial, quando foi utilizada a razão de C:N de 40. Este bioemulsificante foi capaz de emulsionar n-hexadecano, xileno, tolueno, óleo diesel e querosene (JOHNSON *et al.*,1992).

A partir de sacarose como fonte de carbono uma linhagem de *Sphingomonas paucimobilis* GS1 produziu exopolissacarídeo (EPS) com capacidade de emulsionar xileno, parafina e querosene. A concentração de 1g/l de emulsificante foi mais eficiente que as gomas comerciais como arábica e xantana. As emulsões foram estáveis por 6 meses de 4 a 40°C e nos valores de pH entre 4,0 a 10,0. Foi estudado também a toxicidade de ingestão deste EPS por ratos, sendo a quantidade administrada muito maior que a recomendada pela FAO (Food and Agriculture Organization) para aditivos em alimentos. Foi testada a concentração de 5mg/kg de peso corpóreo, o que é muito maior que a concentração de emulsificantes em alimentos, não sendo constatados problemas de toxicidade (ASHTAPUTRE & SHAH,1995).

2.2.3 PRODUÇÃO DE BIEMULSIFICANTES POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Vários fungos têm sido citados na literatura como produtores de bioemulsificantes como o *Ustilago maydis* produtor de manosileritritol lipídeo e ácidos e o *Ustilago zeae* produtor de celobioselipídeo (LANG & WAGNER, 1987).

O fungo *Cladosporium resinae* freqüentemente isolado de tanque de combustíveis é capaz de produzir bioemulsificantes a partir de várias fontes de carbono como óleo diesel, combustível de avião, parafina e hexadecano. O bioemulsificante produzido foi extraído da espuma formada durante a fermentação e purificado com uso de uma mistura de cloroformio:metanol (2:1), sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 25mN/m após 25 dias de fermentação. A atividade emulsificante apresentou maior valor quando comparada a emulsionantes comerciais como triton X100 e SDS (MURIEL, *et al.*1996).

2.3 USO DOS BIOEMULSIFICANTES

O aumento de interesse pelo potencial de aplicação de bioemulsificantes se baseia na sua gama de propriedades funcionais como emulsificação, separação, poder umectante, solubilização, de-emulsificação, inibição da corrosão e redução de viscosidade. Há entretanto várias áreas de aplicação onde os bioemulsificantes podem substituir os surfactantes sintéticos como na agricultura, indústrias de alimentos, limpeza e cosméticos, papelaria, têxtil, farmacêutica, de refino de petróleo e petroquímicas.

Alguns bioemulsificantes já foram patenteados como o "Emulsan", o único comercializado até o momento, para uso na limpeza de tanques de petróleo, melhoria na extração de petróleo e controle ambiental no caso de derramamento de petróleo. Outros bioemulsificantes foram patenteados como aquele produzido por *Candida sp.* com potencial uso para indústria têxtil, farmacêutica e cosmética. Os japoneses têm patenteado o uso de *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, e *Alkaligenes sp.* para produzirem bioemulsificantes (KOSARICK *et al.*, 1987; FIECHTER, 1992).

Com a finalidade de encontrar microrganismos produtores de glicolípídeos INOUE (1988) isolou do solo a levedura *Torulopsis bombicola* KSM36, que a partir de óleo de palma e glicose produziu sofrose lipídeo com rendimento de 0,15g/l. Este glicolípídeo têm compatibilidade com a pele, podendo ser utilizado comercialmente pela indústria cosmética como hidratante para pele.

O uso de bioemulsificantes em produtos alimentícios é mais restrito pelas questões de toxicidade, características sensoriais, custo, propriedades funcionais, fornecedores e legislação. A questão da toxicidade é o fator determinante, sendo necessário que o bioemulsificante seja biologicamente degradado de forma não tóxica, não apenas pelo corpo humano como também pelo meio ambiente (KUDO, 1988).

Outra aplicação possível para alguns microrganismos produtores de bioemulsificantes é a produção de proteína unicelular (SCP) para alimentação. Dentre estes microrganismos, podemos citar a levedura *Candida tropicalis* IIP-4 que

foi cultivada em meio contendo n-hexadecano como fonte de carbono, produzindo bioemulsificantes capazes de emulsionar xileno, tolueno, e hexadecano (SINGH, 1990).

A produção de proteína unicelular e a atividade de emulsificação por *Saccharomyces lipolytica* a partir da fermentação em óleo diesel (5%) como fonte de carbono, apresentaram bons resultados em pH 5,0, com produção de 39% de proteína celular em fermentador de bancada. (SAMPAIO, 1995). A utilização de resíduos aquosos da extração de óleo de oliva pela levedura *Yarrowia lipolytica* (ATCC 20255) produziu 22,5 g/l de proteína unicelular, sendo que após 24 horas de cultivo houve uma redução de 80% da DQO (DE FELICE, 1997).

Apesar de todas as possibilidades de uso dos bioemulsificantes, eles têm sido relatados na literatura com maior frequência pela aplicação na indústria petrolífera para aumentar o rendimento da extração de petróleo, devido a capacidade de reduzir a tensão interfacial entre a água e o óleo com baixa adsorção nas rochas dos reservatórios de petróleo e pelo seu uso em biorremediação, tendo grande vantagem quando comparados aos emulsificantes sintéticos por serem biodegradáveis e terem baixa toxicidade (BROWN & MOSES, 1988).

2.3.1 USO DE BIOEMULSIFICANTES EM BIORREMEDIAÇÃO

A capacidade de microrganismos degradarem hidrocarbonetos foi revisada pioneiramente por ZOBELL (1946), que observou a oxidação de gasolina, querosene e óleo de lubrificação por microrganismos, sugerindo que onde quer que os produtos de petróleo sejam estocados estes estão expostos à presença de água por longos períodos, o que possibilita a existência da degradação dos hidrocarbonetos por microrganismos capazes de emulsioná-los. Várias bactérias, fungos filamentosos e leveduras têm sido estudados como possíveis degradadores de petróleo, porém muitos deles não são capazes de degradar uma mistura complexa de hidrocarbonetos, em geral é necessário um consórcio de microrganismos para degradar os diversos hidrocarbonetos que compõem o petróleo. Este mesmo autor observou que, nos motores à óleo de barcos que

estavam sem uso por muito tempo, houve emulsificação do óleo dos motores com a água do mar contaminante, além de corrosão do motor. Foram isoladas bactérias de dentro dos motores dos barcos com capacidade de oxidar grande número de hidrocarbonetos, sendo estas as responsáveis pela emulsificação do óleo com a água contaminante e a corrosão dos motores pela produção de ácidos. A redução da quantidade de octano da gasolina de avião estocada com resíduos de água foi também atribuída por este autor a ação das bactérias.

O reconhecimento de que os microrganismos degradam os hidrocarbonetos de petróleo naturalmente leva a possibilidade de utilizar microrganismos para remover poluentes derivados de petróleo. A maior fonte de contaminação do mar é o petróleo proveniente dos navios petroleiros. A composição do hidrocarboneto e as condições do meio ambiente têm grande influência na biodegradação do óleo contaminante.

A rápida remoção física e a prevenção de acidentes são métodos preferidos para prevenir a poluição que a biorremediação, que é um método mais lento, porém quando há falhas ou impedimento da remoção física a estimulação da biodegradação pode minimizar a contaminação do meio ambiente. Um exemplo do uso de biorremediação foi o acidente ocorrido com o navio petroleiro "Exxon Valdez", onde o derramamento de petróleo se estendeu pelas águas e praias do Alasca. Neste episódio foram utilizados fertilizantes hidrofóbicos para fornecer nitrogênio e fósforo aos microrganismos autóctones para auxiliar na remoção do óleo (ATLAS, 1978). Segundo este autor o uso de emulsificantes sintéticos em locais onde houve derramamento de petróleo causa mais problemas de poluição que benefícios, devido a sua toxicidade e por serem recalcitrantes. A degradação de petróleo através do uso de microrganismos produtores de bioemulsificantes têm sido indicada freqüentemente como a melhor maneira de remoção de óleo do meio ambiente.

A eficiência da biorremediação também foi comprovada, quando uma população mista de oito bactérias isoladas da espuma formada numa zona cronicamente poluída por hidrocarbonetos, foram capazes de degradar petróleo de forma eficaz em água do mar suplementada por nitrogênio, fósforo e ferro, obtendo 81% de degradação do óleo após 12 dias de incubação à 30°C e pH 8,0. Estas bactérias também foram capazes de produzir bioemulsificantes com lipídeos e açúcares na sua estrutura com alta atividade de emulsificação, comprovando que a

produção de bioemulsificantes têm grande importância na degradação de hidrocarbonetos num meio ambiente poluído com estes (RAMBELOARISOA *et al.*, 1984).

Uma limitação do uso de biorremediação na recuperação de águas e solos contaminados por hidrocarbonetos é devido a falta de nitrogênio e fósforo para o crescimento dos microrganismos. Fertilizantes à base de sais de fósforo e sulfato de amônia juntamente com um consórcio de bactérias foi utilizado numa tentativa de degradar petróleo contaminante, no litoral de Israel. A adesão dos microrganismos e dos fertilizantes na interface óleo/água foi observada por microscópio. Após otimização das condições de crescimento, um consórcio de microrganismos foi inoculado em areia contaminada com petróleo e após 28 dias foi obtida uma degradação de 86%, quando comparado a uma amostra controle (sem adição de bactérias), que apresentou apenas 15 % de degradação. Baseados nesta mesma técnica procedeu-se a limpeza de 200 toneladas de óleo das areias das praias de Israel (ROSENBERG *et al.*, 1992).

No acidente com o petroleiro "Exxon Valdez", já citado anteriormente, também foi utilizado um glicolípideo produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, em uma das praias do Alasca, na tentativa de remover o petróleo aderido às rochas. Várias condições foram testadas: tempo, temperatura e presença ou não de goma xantana. Os resultados mostraram que à 50°C, 1% de bioemulsificante foi mais eficaz removendo 60% do óleo, enquanto que a goma xantana removeu apenas 30% de óleo (HARVEY *et al.*, 1990).

Adição de vários tipos de fertilizantes foram testados em uma praia do Alasca, contaminada pelo derramamento de petróleo do navio petroleiro "Exxon Valdez", na tentativa de degradar o óleo pela microflora natural. Foi verificado que os fertilizantes oleofílicos foram duas vezes mais eficientes se comparados a testes sem adição de fertilizantes. Concluiu-se nesta experiência que a biorremediação em larga escala teve mérito, verificando-se visualmente a remoção do óleo das praias 8-10 dias após a aplicação dos fertilizantes e que além disso diminuiu as chances do óleo voltar para as águas (PRITCHARD *et al.*, 1992).

A remoção de sete hidrocarbonetos contaminantes do solo (54% de sedimentos, 30% areia e 16% de argila) foi conseguida pelo uso de ramnolípideo parcialmente purificado de uma linhagem de *Pseudomonas* UG2. Utilizando-se uma concentração de 0,005g/l de ramnolípideo foi conseguida a extração de 80% de

piridina, 69% de naftaleno, de 30-40 % de antraceno, fenantreno e fluoreno, além de 69% de hexaclorobifenil e 43% de tetraclorobifenil (VAN DIKE, *et al.*,1993). A degradação de óleo diesel, um dos maiores poluentes do solo e das águas próximas a refinarias de petróleo, pode atingir um nível de 82% através do uso de um consórcio de microrganismos após 1 dia em reator de batelada (GEERDINK, *et al.*,1996).

As propriedades dos bioemulsificantes na degradação de hidrocarbonetos que contaminam o meio ambiente são uma ferramenta poderosa no controle da poluição ambiental, com a vantagem sobre os emulsificantes sintéticos por serem biodegradáveis (BANAT, 1995).

Ainda relacionado à biorremediação, podemos comprovar a importância dos bioemulsificantes para recuperar locais contaminados por metais pesados. Cádmio é o segundo metal pesado que mais contamina o solo sendo considerado carcinogênico. O uso de bioemulsificantes para a remediação de solos contaminados por metais pesados foi estudado pela primeira vez por TAN (1994), que utilizou ramnolípido de *Pseudomonas aeruginosa* para a remoção de cádmio. Cádmio de uma solução 0,36 mM foi 100 % recuperado por uma solução de 4mM de ramnolípido, demonstrando seu potencial de biorremediação de solos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro Spectronic 20 Baush & Lomb
- Agitador de tubos Vortex Genie
- Tensiômetro Kruss Processor Tensiometer K 12 V3.11 (Kruss Gmbh Alemanha)
- Centrífuga refrigerada modelo Himac CR 21, Marca Hitachi
- Agitador rotatório "Shaker", marca New Brunswick Scientific
- Balança analítica e semi-analítica marca Mettler
- Autoclave marca Fabbe
- Estufas marca Fanen
- pHmetros marca Micronal.
- Microscópio óptico Karl Zeiss

3.1.2 REAGENTES

- Hidróxido de sódio (lentilhas); fosfato de sódio monobásico e dibásico, fenolftaleína; etanol; benzoato de sódio; glicose; sulfato de manganês, fosfato de sódio dibásico, nitrato de sódio, tolueno; hexano e xileno - grau p.a., marca Merck
- Querosene p.a. marca Fluka; vaselina comercial Conelgo
- Óleo diesel proveniente da Refinaria de Paulínia (REPLAN) com a seguinte composição (dados fornecidos pela REPLAN):
 - Parafina 18-27%
 - Aromáticos 23-34%
 - Naftênicos 35-45%
 - Saturados 60-70%
 - Olefinas 30-46%

-Óleo de soja com a seguinte composição (dados fornecidos pelo fabricante):

Ácidos Graxos Saturados 13.13%

Ácidos Graxos Insaturados 26.5%

Ácido Graxo Linolênico 54.5%

Vitamina E

3.1.3 MEIOS DE CULTURA

-Meios de cultura agar e caldo Extrato de Malte; Peptona; Extrato de Levedura; Caldo Nutriente (CN), agar-agar, todos da marca Difco.

-Meio formulado GYP (2% glicose, 0.5% extrato de levedura, 0,1% peptona)

-Meio formulado Extrato de Malte (EM) (2% extrato de malte, 0,1% peptona, 2% glicose)

-Meio de cultura formulado com Efluente (Meios EF).

Contendo: 1,5% (v/v) de Efluente EF₁ ou EF₂ ou EF₃ ou EF₄, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,1% KH₂PO₄, 0,3% NaNO₃ , 0,1% extrato de levedura, 0.03%.peptona. Sendo as amostras de efluente:

EF₁ - Efluente bruto proveniente da fábrica de sabão (pH de 11,0 a 12,0; temperatura de 60 - 50°C)

EF₂ - Efluente bruto proveniente da fábrica de margarina (pH de 4,5 a 5,5; temperatura de 60 - 50°C)

EF₃ - Efluente do tanque de mistura (pH de 5,5 a 7,0; temperatura de 60 - 50°C)

EF₄ - Efluente do tanque de separação de gordura "Fat Trap" (pH de 3,8 a 4,5; temperatura de 30 - 40°C)

-Meio de cultura formulado com óleo de Soja (Meios OS)

Contendo óleo de soja nas seguintes concentrações: 1,5%, 3% ou 5% adicionados de 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,1% KH₂PO₄, 0,3% NaNO₃, 0,1% extrato de levedura, 0,03%.peptona.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 OBTENÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOEMULSIFICANTES

3.2.1.1 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas de quatro diferentes pontos da estação de tratamento aeróbico de efluentes da fábrica de margarina e sabão da indústria Gessy Lever Ltda., Divisão Van Der Berg Alimentos situada na cidade de Valinhos, de acordo com a Figura 1.

As amostras foram coletadas em frascos plásticos, previamente esterilizados e mantidas em caixa isotérmica durante o transporte até o laboratório, sendo as mesmas assim identificadas:

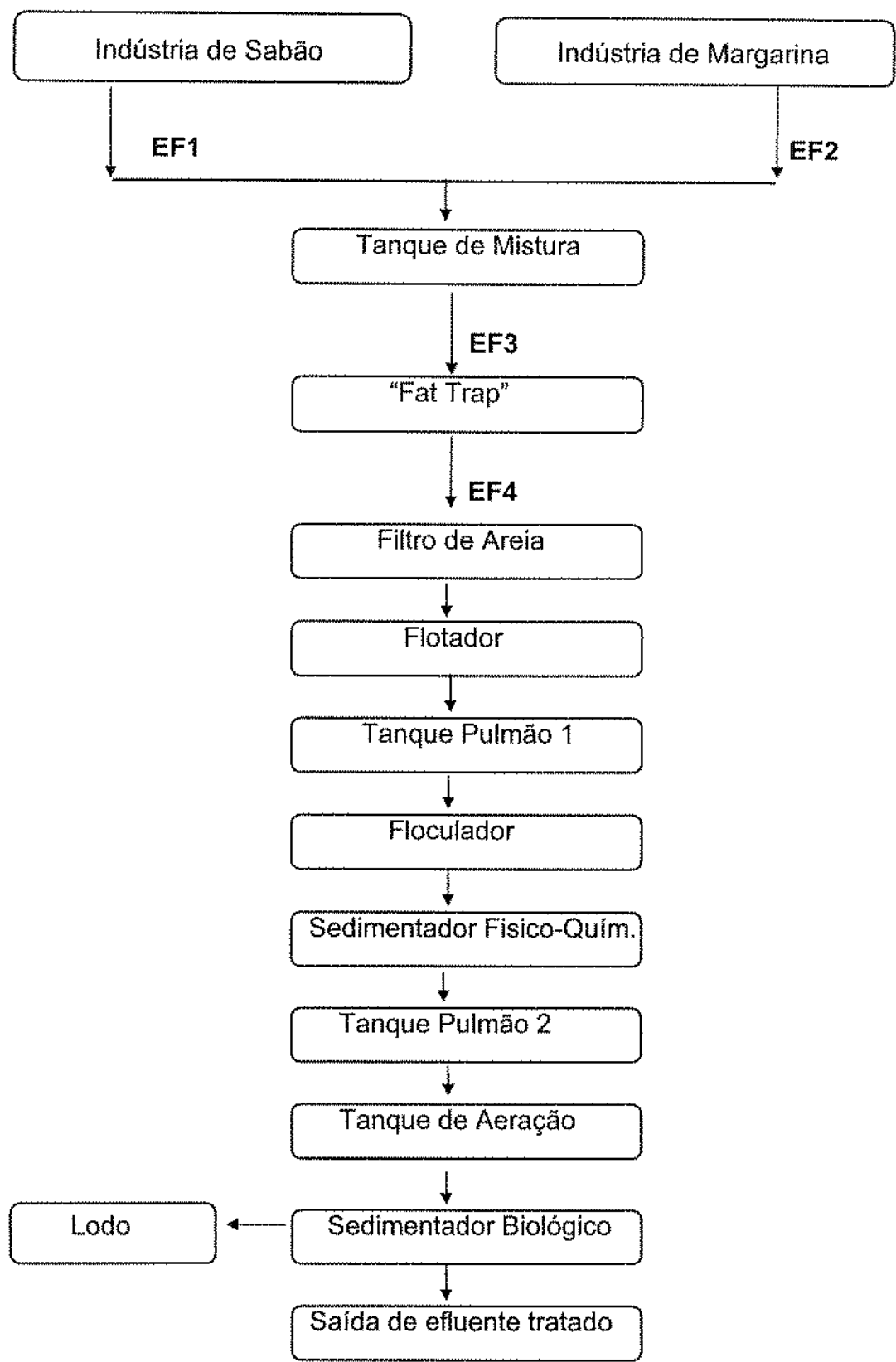
EF₁ - Efluente bruto proveniente da fábrica de sabão

EF₂ - Efluente bruto proveniente da fábrica de margarina

EF₃ - Efluente do tanque de mistura (**EF₁** + **EF₂**)

EF₄ - Efluente do tanque de separação de gordura "Fat Trap"

Figura 1. Diagrama esquemático da estação de tratamento de efluentes



3.2.1.2 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO

Foi inoculado 1 ml das amostras de efluente EF₁, EF₂, EF₃ e EF₄ em 5ml dos meios de cultura líquidos e estéreis: EM, CN e meios de cultura EF correspondentes aos efluentes (1 ml da amostra de EF₁ no meio de cultivo EF₁ assim sucessivamente) para enriquecimento. Todos os meios foram ajustados para os seguintes valores de pH 5,0, 7,0 e 11,0 e incubados às temperaturas de 30°C, 37°C e 55°C por 72 horas de acordo com exemplo da Figura 2.

Após crescimento no meio de enriquecimento foi realizado o isolamento em placas pela técnica de estriamento em superfície, utilizando o mesmo meio de cultura de enriquecimento acrescido de 2% de agar. As placas foram incubadas nas temperaturas previamente utilizadas e foram retiradas as colônias isoladas após 24, 48, 72, 96 horas.

Uma alçada das colônias isoladas foi colocada em tudo de ensaio com 5 ml de água estéril e os tubos agitados vigorosamente. Uma alçada da suspensão de microrganismos de cada um dos tubos foi inoculada em placas com meios de origem pela técnica de estriamento em superfície e incubadas conforme descrito acima. Foram feitas lâminas das colônias reisoladas para estudos da pureza, morfologia além do teste de coloração de Gram no caso de bactérias. Este procedimento foi repetido tantas vezes quantas foram necessárias até a obtenção de cepas puras.

As cepas puras foram inoculadas em tubos contendo meio sólido de origem, inclinado, sendo incubados nas temperaturas de origem. Após crescimento as cepas puras foram preservadas pela adição de vaselina aos tubos e os mesmos mantidos à temperatura de 10°C.

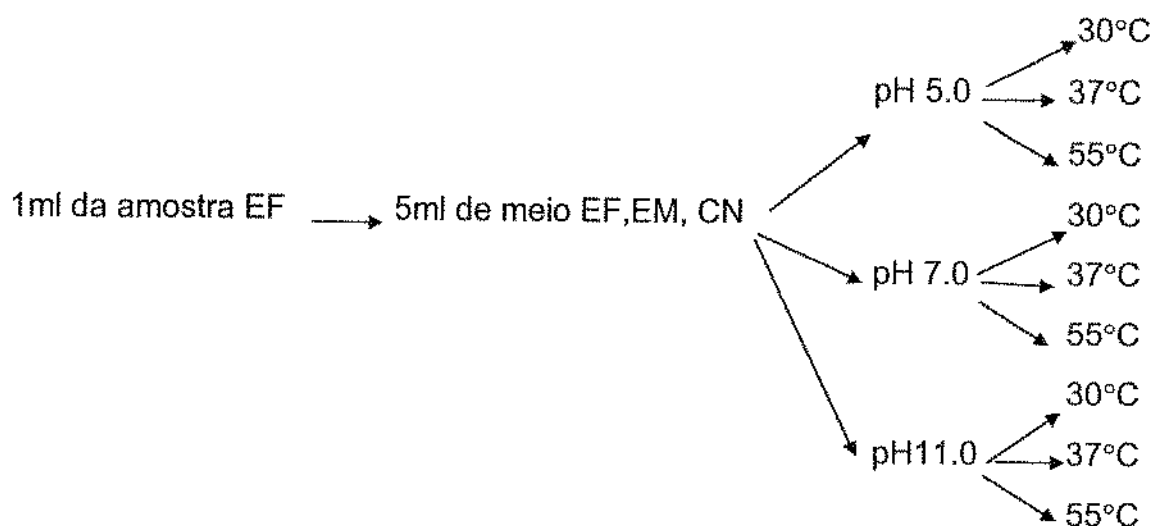


Figura 2. - Esquema de enriquecimento das amostras de efluente.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES DOS MICRORGANISMOS

3.2.3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os isolados obtidos foram cultivados em frascos erlenmeyers de 125 ml de capacidade contendo 50 ml dos meios de cultura a serem testados em agitador rotatório a 150 rpm/30°C. Após o tempo de incubação, o caldo fermentado foi centrifugado (10min/10000rpm/10°C), sendo seus sobrenadantes filtrados em papel Whatman nº1. Os sobrenadantes foram conservados à temperatura de -18°C para ensaios posteriores. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

3.2.3.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSÃO

Para a determinação do Índice de Emulsão (E_{24}) foi utilizado a metodologia desenvolvida por COOPER & GOLDENBERG, (1987) modificado por CARVALHO & DURRANT (1996), onde 2ml da fase hidrofóbica (óleo de soja ou tolueno ou querosene ou diesel ou vaselina ou xileno) a ser testada foi adicionada a 3,5 ml do

sobrenadante, em tubo teste (10 mm x 100 mm). O tubo foi agitado em Vortex por 1 minuto e deixado em repouso por 24 horas. O mesmo foi feito para o tubo controle de todos os compostos hidrófobos testados usando os meios de cultura estéreis.

Após uma hora da agitação do tubo teste foi determinada a absorbância a 540 nm na parte inferior do tubo teste utilizando o método descrito por JOHNSON *et al.* (1992) modificado por CARVALHO & DURRANT (1996).

Para a medida da atividade de emulsificação foi considerada a altura em centímetros da coluna emulsionada (h) subtraído da altura da coluna emulsionada formada no tubo controle (h_c), quando houve a formação de emulsão no tubo controle, dividido pela altura da coluna de líquido total (h_t), multiplicado por 100, obtendo assim o Índice de Emulsão (E_{24}) de acordo com a Figura 3.

$$E_{24} = \frac{h - h_c}{h_t} \times 100$$

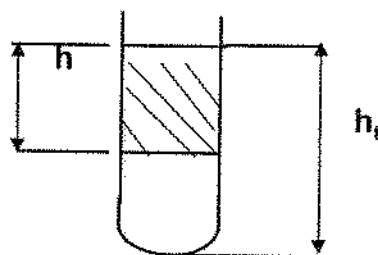


Figura 3 - Medida do Índice de Emulsão (E_{24})

Após as 24 horas de repouso, no mesmo tubo teste, foi determinado o número de gotas emulsionadas (GE) formadas de acordo com o relatado por BRODRERICH *et al.* (1981) de acordo com a observação visual da coluna emulsionada formada sendo definida uma escala arbitrária que varia 0 a ++++ correspondendo ao número de gotas emulsionadas. Na Figura 4 podemos observar além da escala de 0 à ++++, o exemplo da coluna emulsionada formada quando o substrato utilizado é óleo de soja que forma uma coluna emulsionada turva (T) no tubo controle.

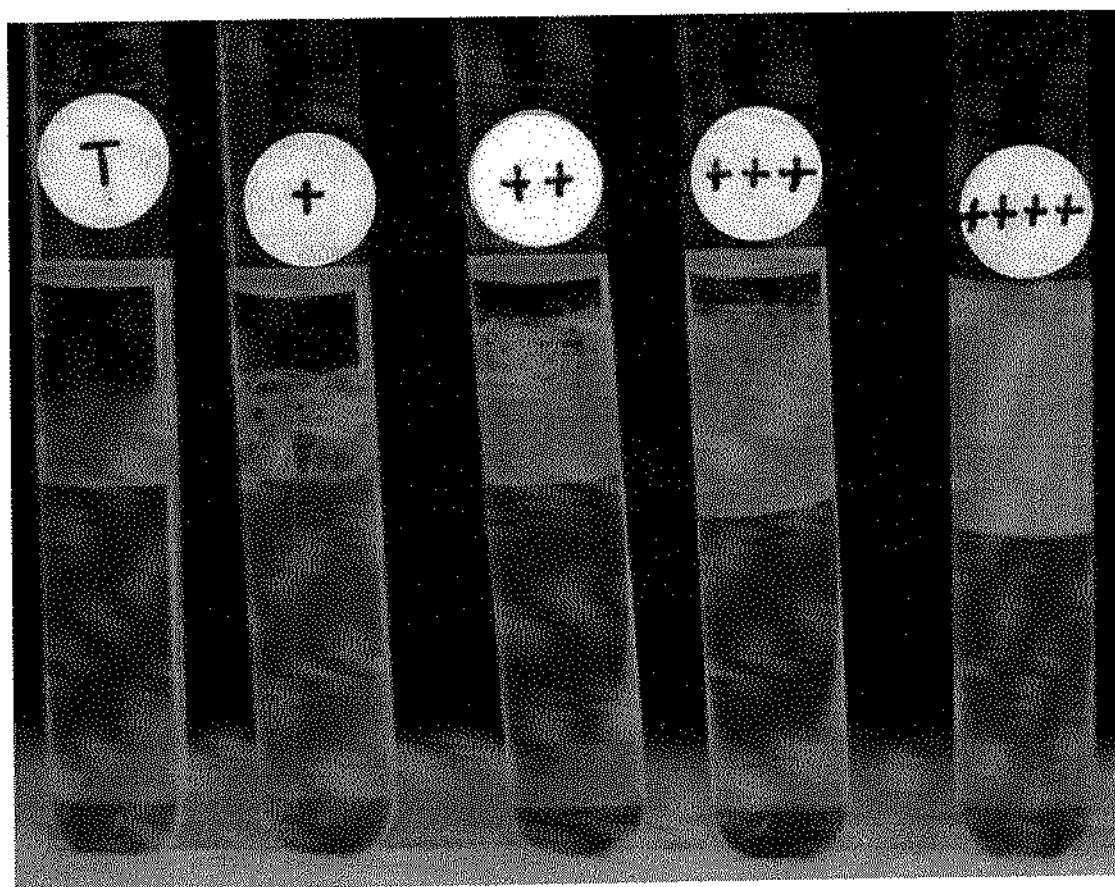


Figura 4 - Número de gotas emulsionadas (GE) de acordo com a escala de intensidade: +, ++, +++, ++++ e T (exemplo de coluna emulsionada turva).

3.2.4 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOEMULSIFICANTES

Para uma seleção preliminar foi inoculado uma alçada de cada isolado em frasco erlenmeyer contendo 50 ml de EF_1 ou EF_2 ou EF_3 ou EF_4 adicionados de sais (0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,3% $NaNO_3$, 0,1% extrato de levedura, 0,03% peptona) sendo o pH ajustado para o pH característico de cada efluente de origem e cultivados por 48 horas no caso de bactérias e leveduras, e 120 horas para fungos.

Os sobrenadantes foram submetidos a teste de emulsão utilizando óleo de soja. Foram selecionadas as linhagens que apresentaram índice de Emulsão $E_{24} \geq 5,0$ e/ou absorvância $\geq 0,35$ e com o maior número de gotas emulsionadas.

Os microrganismos selecionados foram submetidos a segunda fase de seleção, sendo inoculados da mesma forma em meio GYP e em meio OS contendo 3% de óleo de soja, previamente descritos em 3.2.3.1 e tiveram pH ajustado para

7.0. Os frascos foram incubados por 48 horas em agitador rotatório (150rpm/30°).

Foi realizado o teste de emulsão utilizando óleo de soja como composto hidrofóbico e as linhagens que apresentaram $E_{24} \geq 33,0$ % e/ou absorbância $\geq 0,35$ e com no mínimo ++ na escala de gotas emulsionadas.

Os microrganismos selecionados na segunda etapa foram cultivados em meio OS contendo diferentes concentrações de óleo de soja (1,5, 3,0 e 5,0%) e em meio GYP. Os tempos de incubação foram 10, 24, 48 e 96 horas à 30°C na terceira etapa de seleção. Os filtrados foram testados quanto a capacidade de emulsionar: óleo de soja, querosene, tolueno, vaselina e xileno. Foram selecionados os microrganismos que apresentaram os maiores valores de E_{24} e/ou absorbância $\geq 0,35$ e com máximo de gotas emulsionadas nos menores tempos de fermentação, além de apresentarem capacidade de emulsionar todos os compostos hidrófobos testados.

3.2.5 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE EM DIFERENTES VALORES DE pH E TEMPOS DE CULTIVO

Os microrganismos selecionados foram testados no meio de melhor atividade obtido no item 3.2.4, usando como pré-inóculo (2% v/v) uma cultura de 24 horas cultivada em 50 ml de meio incubado sob agitação(150rpm/30°C). O pH do meio foi ajustado para 5,0, 7,0 e 11,0 e os frascos foram mantidos em agitador rotatório (150rpm/30°C). Após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação foi determinado o índice de Emulsão (E_{24}) usando óleo de soja, querosene, tolueno, óleo diesel e xileno para cada valor de pH e tempo de cultivo de acordo com o método descrito no item 3.2.3.

3.2.6 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL

Foi utilizado o mesmo ajuste de metodologia adaptado por SANTOS (1997). Um volume de 48 ml de sobrenadante das culturas cultivadas no item 3.2.5 foi

utilizado para medida da Tensão Superficial. Foi utilizado o tensiômetro Kruess Processor K12 V3.11 com placa de platina iriada (Placa de Wilhelm) de perímetro molhado de 40 mm, 19,9 mm de comprimento e 0,1 mm de espessura. O equipamento foi programado para trabalhar com desvio padrão referente a 5 medidas $\leq 0,2$ mN/m. A calibração do aparelho foi feita com água destilada de tensão superficial aproximada de 72 mN/m.

3.2.7 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

A Biomassa seca foi determinada pelo método descrito por COOPER & GOLDENBERG (1987) através da centrifugação (10000rpm/10min/10°C) dos caldos fermentados descritos no item 3.2.5 em tubos de centrifuga tarados. A massa celular obtida foi lavada 2 vezes com água destilada no caso do meio utilizado ser GYP, e lavada 2 vezes com hexano no caso de meio OS. Os tubos foram secos por 24h em estufa à 100 °C, resfriados em dessecador, a massa seca foi determinada pela diferença de pesos obtida em balança analítica.

3.2.8 DETERMINAÇÃO DA REDUÇÃO DA DQO PELO CULTIVO EM EFLUENTE

As linhagens obtidas da terceira etapa de seleção foram pré-inoculadas em 100% do efluente de origem dos microrganismos selecionados adicionado de sais (0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,3% NaNO_3 , 0,1% extrato de levedura, 0,03%.peptona) estéril por 48 horas. Foram inoculados 2% deste pré-inóculo em meio estéril contendo 100% do efluente EF adicionado de sais e incubados por 10, 24, 48 e 96 horas sob agitação (150rpm/30°C).

A determinação de redução da DQO foi realizada no Laboratório de Tratamento de Efluentes da Gessy Lever, utilizando o padrão desenvolvido por GREENBERG, *et al.* (1992) o qual se baseia na medida do oxigênio equivalente ao

conteúdo da matéria orgânica na amostra que é susceptível a oxidação por um forte oxidante químico. O método de DQO baseia-se no fato de que a maioria das matérias orgânicas são oxidadas pela mistura de ácido sulfúrico e ácido crômico em ebulição. A mistura é refluxada em forte solução ácida com massa conhecida de dicromato de potássio em excesso. Após a digestão o dicromato de potássio não reduzido remanescente é titulado com sulfato de ferro amoniacal para determinar a quantidade de dicromato de potássio consumida e a matéria orgânica oxidável é calculada em termos de oxigênio equivalente. Para amostras de fontes específicas a DQO pode ser relacionada empiricamente com a DBO.

A DBO é a medida da demanda bioquímica de oxigênio tendo como princípio a determinação empírica dos requerimentos de oxigênio de resíduos aquosos, efluentes e águas poluídas. Este método é aplicado a plantas de tratamento de efluentes para avaliar a eficiência de remoção de DBO. Este teste mede o oxigênio utilizado durante um período de incubação específico (5 ou 20 dias) para a degradação bioquímica da matéria orgânica. Por ser um método demorado comumente utiliza-se a determinação de DQO e faz-se uma correlação com a DBO.

3.2.9 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Segundo SINGER citado por WAGNER (1988) a atividade hemolítica indica a produção extracelular de compostos de superfície ativa, em geral de natureza glicolípídica. Para verificar a atividade hemolítica foram inoculadas, em uma placa de petri contendo o meio Agar Sangue, as linhagens selecionadas previamente da terceira etapa de seleção e incubada à 30°C. O resultado positivo é dado pela formação de halo claro em volta da colônia devido a lise das células vermelhas do sangue na placa após 48 horas de incubação.

3.2.10 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOEMULSIFICANTES

As linhagens isoladas com melhor capacidade de produção de bioemulsificantes foram identificadas de acordo com o descrito no manual Bergey (1986) e McFaddin (1980).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICRORGANISMOS ISOLADOS DE EFLUENTES

Foram obtidas 111 cepas puras a partir dos efluentes EF₁, EF₂, EF₃ e EF₄, sendo 30 cepas provenientes do EF₁, 20 do EF₂, 23 do EF₃, e 38 do EF₄. Dentre estes isolados 88 são bactérias, 12 são fungos filamentosos e 11 são leveduras, sendo a maioria das bactérias isoladas bastonetes gram positivos. A porcentagem de bactérias, fungos filamentosos e leveduras isolados dos efluentes são mostrados na Tabela 4 e as características morfológicas e origem das cepas isoladas podem ser observadas nas Tabelas A1, A2, A3 e A4 no apêndice A.

Não foi encontrado na literatura o uso de efluentes de indústrias de alimentos como fonte de isolamento de microrganismos produtores de bioemulsificantes. As fontes usuais de obtenção destes microrganismos em geral são solos e águas contaminados por hidrocarbonetos e óleo (KOSARIC, *et al.*, 1987).

Segundo comunicação verbal da equipe técnica da estação de tratamento de efluentes da Gessy Lever a maior parte da carga orgânica dos efluentes provenientes da fábrica de margarina e sabão são óleos e gorduras, sendo estes de difícil degradação na estação de tratamento de efluentes. Os efluentes da fábrica de margarina são constituídos de misturas de óleos vegetais e os efluentes da fábrica de sabão contém gordura animal (sebo) além de misturas de óleos vegetais. Devido a composição destes efluentes os mesmos foram escolhidos como fonte de isolamento de microrganismos produtores de bioemulsificantes devido a probabilidade de encontrar microrganismos capazes de produzirem bioemulsificantes, o que foi confirmado pelos resultados descritos neste trabalho.

A utilização de efluentes industriais para a produção de bioemulsificantes tem sido descrita na literatura por MERCADE & MANRESA (1994) que utilizaram resíduos industriais da produção de óleo de oliva para a produção de ramnolípideo por *Pseudomonas sp.* e por BABU *et al.* (1996), que reportaram o uso de efluentes industriais de destilarias de uísque e soro de leite de usinas de beneficiamento de leite para a produção de bioemulsificantes por *Pseudomonas aeruginosa*.

TABELA 4 - PORCENTAGEM DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE EFLUENTES DE INDÚSTRIA DE MARGARINA E SABÃO

	EF ₁	EF ₂	EF ₃	EF ₄
Microrganismo	(%)	(%)	(%)	(%)
Bactérias	80	85	66,7	83,8
Fungos	10	10	25	2,7
filamentosos				
Leveduras	10	5	8,3	13,5

4.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOEMULSIFICANTES SELECIONADOS

As Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 apresentam os valores de índice de Emulsificação (E_{24}) e os valores de absorvância ($\lambda = 540$ nm) para os 111 microrganismos isolados dos efluentes. Dezoito microrganismos apresentaram capacidade de produzir bioemulsificantes a partir de efluente de indústria de margarina e sabão e foi possível observar que a coluna emulsionada formada é turva. Utilizou-se como critério de seleção o valor de $E_{24} \geq 5,0$ e absorvância $\geq 0,35$ nas condições já descritas.

Os dezoitos isolados selecionados foram A17, A26, B1, B4, B9, B12, C6, C16, D3, D12, D13, D14, D17, D19, D20, D24, D29 e D30 conforme apresentado nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 por apresentarem $E_{24} \geq 5,0$ e absorvância $\geq 0,35$. Os fungos apesar de apresentarem $E_{24} \geq 5,0$ não foram selecionados devido ao longo tempo de incubação (120 horas) e por apresentarem valores de Índice de Emulsificação semelhantes às bactérias e leveduras selecionadas com 48 horas de cultivo.

TABELA 5 - Índice de Emulsão (E_{24}), absorvância (540 nm) e gotas emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes de fábrica de sabão (EF₁) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C por 48 horas

Amostra	E_{24}	GE	ABS.
A26*	0	-	0,56
A17*	0	-	0,43
A2	0	-	0,34
A7	0	-	0,28
A8	0	-	0,14
A16	0	-	0,13
A21	0	-	0,11
A5	0	-	0,10
A20	0	-	0,10
A27	0	-	0,10
A14	0	-	0,08
A25	0	-	0,08
A24	0	-	0,05
A4	0	-	0,03
A3	0	-	0,03
A1	0	-	0,00
A6	0	-	0,00
A9	0	-	0,00
A10	0	-	0,00
A11	0	-	0,00
A12	0	-	0,00
A13	0	-	0,00
A15	0	-	0,00
A18	0	-	0,00
A19	0	-	0,00
A22	0	-	0,00
A23	0	-	0,00

(-) Não formação de gotas emulsionadas

T - Formação de emulsão turva

* - Linhagens selecionadas

TABELA 6 - Índice de Emulsão (E_{24}), absorbância (540 nm) e gotas emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes de fábrica de margarina (EF_2) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C por 48 horas

Amostra	E_{24}	GE	ABS.
B12*	8,33	T	0,29
B1*	5,00	T	0,01
B9*	5,00	T	0,04
B4*	6,60	T	0,00
B10	1,67	T	0,00
B11	1,67	T	0,00
B5	1,60	T	0,00
B6	1,60	T	0,00
B2	0	-	0,04
B3	0	-	0,00
B7	0	-	0,00
B8	0	-	0,00
B13	0	-	0,00
B14	0	-	0,00
B15	0	-	0,00
B16	0	-	0,00
B17	0	-	0,00
B18	0	-	0,17

(-) Não formação de gotas emulsionadas

T - Formação de emulsão turva

* - Linhagens selecionadas

TABELA 7 Índice de Emulsão (E_{24}), absorbância (540 nm) e gotas emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes do tanque de mistura (EF_3) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C por 48 horas

Amostra	E_{24}	GE	ABS.
C16*	5,83	T	0,03
C6*	5,00	T	0
C12	4,16	T	0
C15	4,16	T	0,10
C14	2,50	T	0,29
C1	0	-	0,08
C2	0	-	0,10
C3	0	-	0,04
C4	0	-	0,00
C5	0	-	0,03
C7	0	-	0
C8	0	-	0,07
C9	0	-	0,07
C10	0	-	0,14
C11	0	-	0
C13	0	-	0,03
C17	0	-	0,31

(-) Não formação de gotas emulsionadas

T - Formação de emulsão turva

* - Linhagens selecionadas

TABELA 8 - Índice de Emulsão (E_{24}), absorvância (540 nm) e gotas emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas por sobrenadante de efluentes do tanque “fat trap” (EF_4) fermentados por bactérias e leveduras à 30°C por 48 horas

Amostra	E24	GE	ABS.
D8	4,20	T	0
D11*	4,20	T	0,27
D6	2,50	T	0
D35	1,66	T	0
D5	1,60	T	0,07
D1	0	-	0
D2	0	-	0,02
D3	0	-	0,45
D4	0	-	0,23
D7	0	-	0
D9	0	-	0
D10	0	-	0
D12*	0	-	0,60
D13*	0	-	0,36
D14*	0	-	0,71
D15	0	-	0,09
D16	0	-	0,06
D17*	0	-	0,58
D18	0	-	0,19
D19*	0	-	0,81
D20*	0	-	0,75
D21	0	-	0
D22	0	-	0
D23	0	-	0
D24	0	-	0,28
D25	0	-	0
D26	0	-	0
D27	0	-	0
D28	0	-	0
D29*	0	-	0,65
D30*	0	-	0,73
D31	0	-	0
D32	0	-	0
D33	0	-	0
D34	0	-	0
D36	0	-	0
D37	0	-	0

(-) Não formação de gotas emulsionadas

T - Formação de emulsão turva

* - Linhagens selecionadas

TABELA 9 - Índice de Emulsão (E24),absorbância (540 nm) e gotas emulsionadas (GE) de emulsão de óleo de soja em água estabilizadas pelos sobrenadantes dos efluentes EF₁, EF₂, EF₃ e EF₄ fermentados por fungos filamentosos à 30°C por 120 horas

Amostra	Meio	E24	GE	ABS.
C20	EF3	6,60	T	0,10
C21	EF3	6,60	T	0
A29	EF1	5,83	T	0,07
A28	EF1	3,33	T	0,05
A30	EF1	0	-	0
B13	EF2	0	-	0
B14	EF2	0	-	0
C18	EF3	0	-	0,19
C19	EF3	0	-	0,05
C22	EF3	0	T	0
C23	EF3	0	-	0,22
D32	EF4	0	-	0,03

(-) Não formação de gotas emulsionadas

T - Formação de emulsão turva

Os dezoito isolados selecionados na primeira etapa de seleção foram testados quanto à capacidade de produzir bioemulsificantes a partir dos meios de cultura GYP contendo glicose como principal fonte de carbono e meio OS contendo 3% de óleo de soja de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.4.

A partir dos resultados mostrados na Tabela 10 podemos observar que algumas linhagens apresentaram alto Índice de Emulsificação ($\geq 44,0\%$) quando cultivadas nos dois meios testados. Observa-se também que as gotas emulsionadas (GE) apresentaram variação de T para até +++, indicando uma maior produção de bioemulsificantes a partir destes substratos. Os valores de absorbância foram menores que os obtidos a partir do meio EF não sendo maiores que 0,22. Os isolados que apresentaram maior Índice de Emulsão, maior absorbância e maior número de gotas emulsionadas (GE) foram selecionados.

As treze linhagens selecionadas foram: A26, B1, B4, B9, B12, D3, D11, D13, D14, D19, D20, D29 e D30.

TABELA 10 - Índice de Emulsão (E_{24}), absorvância (540 nm) e gotas emulsionadas (GE) da emulsão de óleo de soja em água estabilizadas pelos sobrenadantes dos meios de cultivo GYP e OS 3% fermentados por bactérias e leveduras à 30°C por 48 horas

MEIO GYP				MEIO OS 3%		
Amostra	E_{24}	GE	ABS.	E_{24}	GE	ABS.
B1*	44,06	++++	0,21	36,03	++++	0
B9*	41,67	++++	0,22	41,66	++++	0
D3*	41,67	++++	0,10	33,33	+	0
D19*	41,67	++	0	12,50	T	0
D29*	41,66	++++	0	10,83	T	0
D20*	39,09	++++	0	4,16	+	0
D11*	35,83	++	0	12,5	T	0
D13*	28,95	+	0	33,33	++	0,10
D14*	10,83	+	0	36,37	++	0
D34	10,83	+	0	4,16	T	0
C6	10,83	+	0	12,25	T	0
D30*	10,00	T	0	36,67	++++	0
D12	9,10	T	0	12,50	T	0
D18	7,50	T	0	12,50	T	0,02
B4*	6,67	T	0	33,33	++	0
A17	0	-	0	6,70	T	0
B12*	0	-	0	35,0	++	0
A26*	0	-	0	38,33	++	0,20

*- Linhagens selecionadas

(-) Não formação de gotas emulsionadas

(+) Escala de GE: +, ++, +++, ++++ e T (Formação de emulsão turva),

A utilização de glicose e óleos vegetais para a produção de bioemulsificantes vem sendo estudada por vários autores. KITAMOTO *et al.* (1990) reportaram o uso de diferentes óleos vegetais por *Candida antarctica* para a produção do bioemulsificante manosil eritritol lipídeo. A partir de glicose uma linhagem de

Pseudomonas aeruginosa produziu ramnolípdeo nos estudos conduzidos por GUERRA-SANTOS *et al.* (1984).

Os treze microrganismos selecionados foram inoculados em meio GYP e meios OS contendo 1,5, 3,0 e 5,0% de óleo de soja e incubados por 10, 24, 48, 72 e 96 horas em agitador rotatório (150rpm/30°) cujos resultados dos Índices de Emulsificação, GE e absorbância em relação a emulsão de óleo de soja, querosene, tolueno e vaselina estão apresentados nas Tabelas B1 à B13 no apêndice B.

A partir destas tabelas foi construída a Tabela 11 onde podemos observar que as linhagens denominadas B1 e B9, isoladas a partir do efluente proveniente da fábrica de margarina, apresentaram os maiores índices de Emulsificação quando cultivadas em meio GYP e OS nos menores tempos de incubação.

As linhagens B1 e B9 foram capazes de emulsionar todos os compostos testados exceto vaselina que não apresentou bons índices de emulsão quando estas linhagens foram cultivadas no meio OS, portanto nos demais testes a vaselina foi substituída por óleo diesel.

As demais linhagens apresentaram baixos Índices de Emulsificação em ambos os meios e não foram capazes de emulsionar todos os compostos testados. Na Tabela 11 podemos comparar a linhagem D14 que representa o comportamento da maioria das linhagens não selecionadas, com as linhagens B1 e B29 selecionadas como melhores produtores de bioemulsificantes.

O cultivo em meio GYP apresentou os melhores índices de emulsificação nos menores tempos de cultivo, sendo utilizado como o melhor meio para a produção de bioemulsificantes para os demais testes.

Nesta etapa de seleção observamos que a medida de absorbância foi prejudicada devido a aderência de gotículas do composto testado na parte inferior do tubo teste. Os valores da absorbância obtidos não foram reprodutíveis não sendo utilizada a absorbância como parâmetro de seleção. Para os testes posteriores a esta etapa foram realizados apenas a determinação do índice de Emulsificação (E_{24}) e o número de Gotas Emulsionadas (GE).

TABELA 11 - Índice de Emulsificação do sobrenadante das culturas das linhagens D14, B1 e B9 em relação a: Óleo de soja (OS), Querosene (Q), Tolueno (T), Vaselina (V) e Xileno(X)

LINHAGEM B1																										
Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO OS 1,5%					MEIO DE CULTIVO OS 3%					MEIO DE CULTIVO OS 5%					MEIO DE CULTIVO GYP										
	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	
10	0	28,85	13,21	0	29,41	0	36,36	28,85	0	40,00	0	36,36	34,61	0	36,36	0	35,71	0	36,36	0	44,44	45,45	46,29	44,64	45,45	
24	0	45,45	41,51	40,00	39,29	0	40,00	42,3	0	45,45	0	40,00	40,00	0	45,45	0	42,10	44,44	36,36	0	44,44	45,45	46,29	44,64	45,45	
48	0	36,36	34,55	9,00	35,71	0	35,71	39,62	0	36,36	0	36,36	40,00	0	40,00	0	43,00	40,00	9,00	27,27	44,44	45,45	46,29	44,64	45,45	
96	0	37,03	42,6	0	36,36	0	35,71	40,00	0	45,45	0	39,29	42,00	0	40,00	44,44	45,45	46,29	44,64	45,45	46,29	44,64	45,45	46,29	44,64	45,45

LINHAGEM B9																										
Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO OS 1,5%					MEIO DE CULTIVO OS 3%					MEIO DE CULTIVO OS 5%					MEIO DE CULTIVO GYP										
	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	
10	3,70	32,14	0	0	26,78	0	32,14	5,45	0	0	7,20	29,09	7,40	0	33,93	0	37,50	10,90	0	0	0	0	0	0	0	0
24	3,70	16,66	0	0	28,07	10,71	38,59	44,64	0	43,63	0	0	0	0	10,71	0	10,71	35,71	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	30,36	19,64	0	39,28	0	33,33	33,92	0	33,92	0	3,57	0	0	12,5	0	12,55	27,77	30,90	0	0	0	0	0	0	0
96	0	36,36	0	0	23,63	0	0	25,00	0	25,00	0	39,28	42,59	28,85	44,64	45,28	43,86	47,27	45,45	47,27	45,45	47,27	45,45	47,27	45,45	47,27

LINHAGEM D14																					
Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO OS 1,5%					MEIO DE CULTIVO OS 3%					MEIO DE CULTIVO OS 5%					MEIO DE CULTIVO GYP					
	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	OS	Q	T	V	X	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,60	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20,00	17,60	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39,00	15,80	26,80	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35,00	17,06	38,46	9,43	11,32

4.3 INFLUÊNCIA DO pH DO MEIO DE CULTIVO NA REDUÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL

A influência do pH do meio de cultivo sobre as linhagens selecionadas B1 e B9 foi analisada quanto a produção de bioemulsificantes capazes de reduzir a tensão superficial do meio GYP, durante os seguintes tempos de cultivo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

De acordo com a Tabela C1 e C2 no apêndice C observou-se que a redução da tensão superficial foi pequena para ambas as linhagens quando cultivadas em meio GYP nos valores de pH 5,0, 7,0 e 11,0.

A linhagem B1 quando cultivada em pH 5,0 apresentou após um valor médio de redução da tensão superficial de 9,61 mN/m após 24 horas de cultivo. Quando cultivada em pH 7,0 apresentou um valor médio de redução da tensão superficial de 8,44 mN/m após 10 horas de cultivo e quando cultivada em pH 11,0 apresentou um valor médio de redução da tensão superficial de 12,76 mN/m após 72 horas de cultivo.

A linhagem B9 quando cultivada em pH 5,0 apresentou um valor médio de redução da tensão superficial de 10,06 mN/m após 48 horas de cultivo. Quando cultivada em pH 7,0 apresentou um valor médio de redução de tensão superficial de 7,72 mN/m após 12 horas de cultivo e quando cultivada em pH 11,0 apresentou a maior redução da tensão superficial de 10,88 mN/m após 48 horas de cultivo.

Na literatura são relatados estudos de bioemulsificantes com capacidade de reduzir a tensão superficial da água ou meio de cultura. Porém há vários exemplos de microrganismos com atividade bioemulsificante não associada à redução da tensão superficial.

Nos estudos relatados por HOROWITZ *et al.*(1990) onde a partir de glicose como fonte de carbono uma linhagem de *Bacillus licheniformis* (86) foi relatada como produtora de bioemulsificantes que reduzem a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m na concentração de 10 µg/ml (bioemulsificante parcialmente purificado). Estes mesmos valores de redução da tensão superficial (de 72 para 27N/m) foram obtidos por JENNY *et al.*(1991), quando uma linhagem de *Bacillus licheniformis* foi fermentada em meio contendo glicose como fonte de carbono,

utilizando a concentração de 15 mg/l de bioemulsificante, valores de redução de tensão superficial que foram considerados altos por estes autores.

Porém os dados obtidos por COOPER *et al.* (1981a) mostram que estes autores obtiveram uma pequena diminuição dos valores de tensão superficial, quando uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* (17423) foi cultivada em meio contendo xileno e querosene como fonte de carbono, provocando uma redução da tensão superficial de 13 mN/m quando crescida em meio contendo querosene e de 8mN/m quando em meio contendo xileno. Apesar dos baixos valores de tensão superficial esta linhagem conseguiu emulsionar uma mistura de querosene e fase aquosa contendo bioemulsificante atingindo 62% de emulsificação.

Uma pequena diminuição de tensão superficial também foi reportada por ASHTAPUTRE & SHAH (1995), quando *Sphingomonas paucimobilis* cultivada em meio contendo sacarose produziu um exopolissacarídeo. A redução da tensão superficial foi pequena mas este bioemulsificante foi capaz de estabilizar emulsões com diversos hidrocarbonetos. Estes mesmos autores acreditam que o fato de ocorrer emulsão apesar da pequena redução da tensão superficial indica que o efeito de estabilização da emulsão não se deve as propriedades de tensão superficial e sim pela formação de um filme interfacial que funciona como uma barreira prevenindo a coalescência das gotas dispersas.

Os autores GUTNICK & SHABTAI (1987) estudando o "Emulsan" produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, também observaram pequena redução de tensão superficial e sugerem a formação de um filme interfacial. Os valores de tensão superficial obtidos neste estudo são considerado baixos quando comparados aos dados encontrados na literatura e podem ser explicados pelos argumentos apresentados por ASHTAPUTRE & SHAH (1995) e GUTNICK & SHABTAI (1987).

4.4 INFLUÊNCIA DO pH NA PRODUÇÃO DA BIOMASSA

Pela análise dos dados das Tabelas 12 e 13 e das Figuras 5 e 6 podemos observar, no pH 7,0 após 12 horas de fermentação, que a biomassa produzida pela linhagem B1 (0,47g/l) e B9 (0,51 g/l) foi praticamente a mesma. Não houve

alterações significativas de biomassa após 24 horas de cultivo da linhagem B1 em pH 7,0, porém a linhagem B9 dobrou a biomassa após 96 horas de cultivo neste mesmo pH.

A linhagem B1 apresentou valores máximos de biomassa após 72 horas de cultivo quando cultivada em pH 11,0, após 48 horas de cultivo no pH 5,0 e após 24 horas no pH 7,0.

Os valores máximos de biomassa da linhagem B9 foram atingidos também no tempo de 72 horas quando cultivada em pH 11,0 e após 48 horas de cultivo em pH 5,0 e 7,0. Os valores máximos do índice de emulsificação foi verificado após o máximo de produção de massa celular.

TABELA 12 - Efeito do pH do meio GYP na produção de massa seca (g/l) pela linhagem B1

TEMPO (h)	pH 5,0	pH 7,0	pH 11,0
0	0	0	0
12	0,05	0,47	0,03
24	0,17	0,57	0,06
48	0,41	0,56	0,34
72	0,45	0,46	0,76
96	0,52	0,68	1,13

TABELA 13 - Efeito do pH do meio GYP na produção de massa seca (g/l) pela linhagem B9

TEMPO (h)	pH 5,0	pH 7,0	pH 11,0
0	0	0	0
12	0,08	0,51	0,02
24	0,37	0,64	0,11
48	0,82	0,74	0,79
72	0,91	0,74	1,15
96	0,85	1,08	1,18

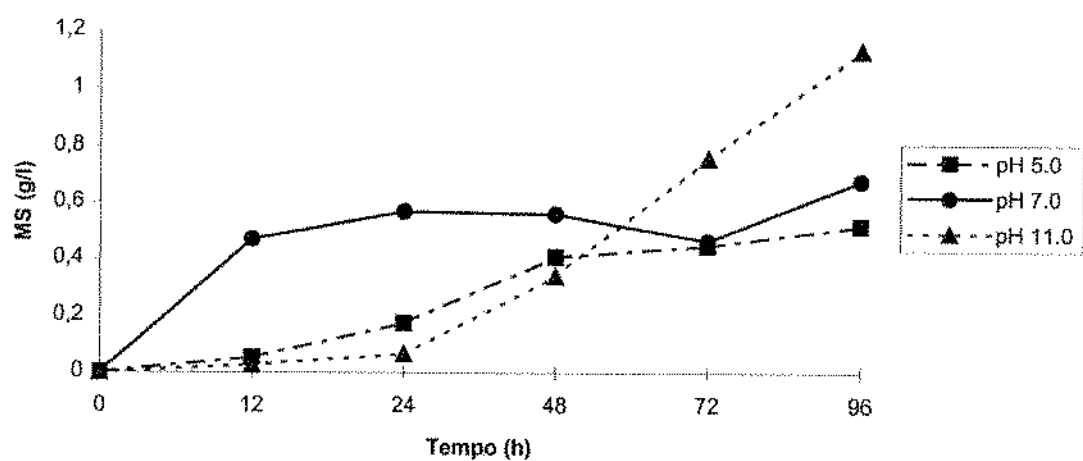


Figura 5 - Efeito do pH inicial do meio GYP na produção de massa seca pela linhagem B1

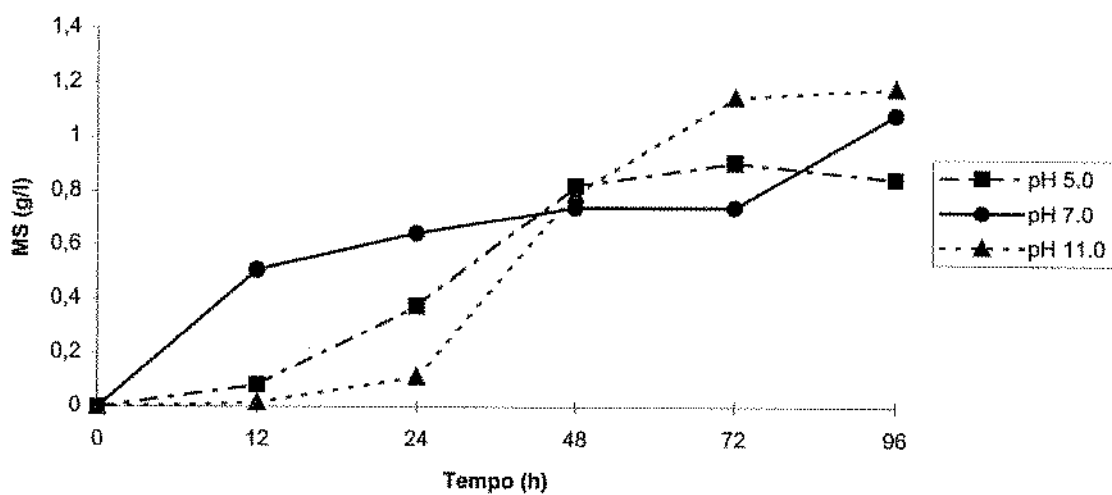


Figura 6 - Efeito do pH inicial do meio GYP na produção de massa seca pela linhagem B9

4.5 EFEITO DO pH DO MEIO DE CULTURA NO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DA EMULSÃO DE ÓLEO DE SOJA, QUEROSENE, TOLUENO, XILENO E ÓLEO DIESEL EM SOBRENADANTE DAS CULTURAS B1 E B9

Os resultados da influência do pH no Índice de Emulsão em relação aos diversos compostos testados estão expostos nas Tabelas D1 à D10 no apêndice D. Na Tabela 14 podemos verificar que tanto para a linhagem B1 quanto B9 a formação máxima de emulsão, isto é maior número de gotas emulsionadas (+++++) tem início para todos os compostos testados após 24 horas de cultivo quando o meio GYP foi ajustado a pH 5,0; 10 horas quando em pH 7,0 exceto para óleo diesel (onde o tempo foi de 12 horas) e 72 horas para o pH 11,0, com exceção de tolueno para a linhagem B1. O óleo diesel não foi emulsionado pelo sobrenadante do cultivo da linhagem B9 com pH inicial 11,0.

As linhagens B1 e B9 produziram bioemulsificantes em todos os valores de pH testados que foram capazes de emulsionar compostos aromáticos, como tolueno e xileno, assim como misturas de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos, como querosene e óleo diesel, além de triglicerídeos como óleo de soja.

Os maiores valores de Índice de Emulsão foram obtidos quando estas linhagens foram cultivadas em meio GYP à pH 7,0, com valores variando de 33,0 % à 46,6 %, dependendo do composto testado, após 10 horas de cultivo. Após atingido o máximo de gotas emulsionadas os valores médios do Índice de Emulsão mantiveram-se constantes até o tempo de 96 horas de cultivo.

Nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11 são apresentados os gráficos do Índice de Emulsão da linhagem B1 para óleo de soja, querosene, tolueno, óleo diesel, xileno nos diferentes valores de pH testados e nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16 encontramos os dados referentes para a linhagem B9.

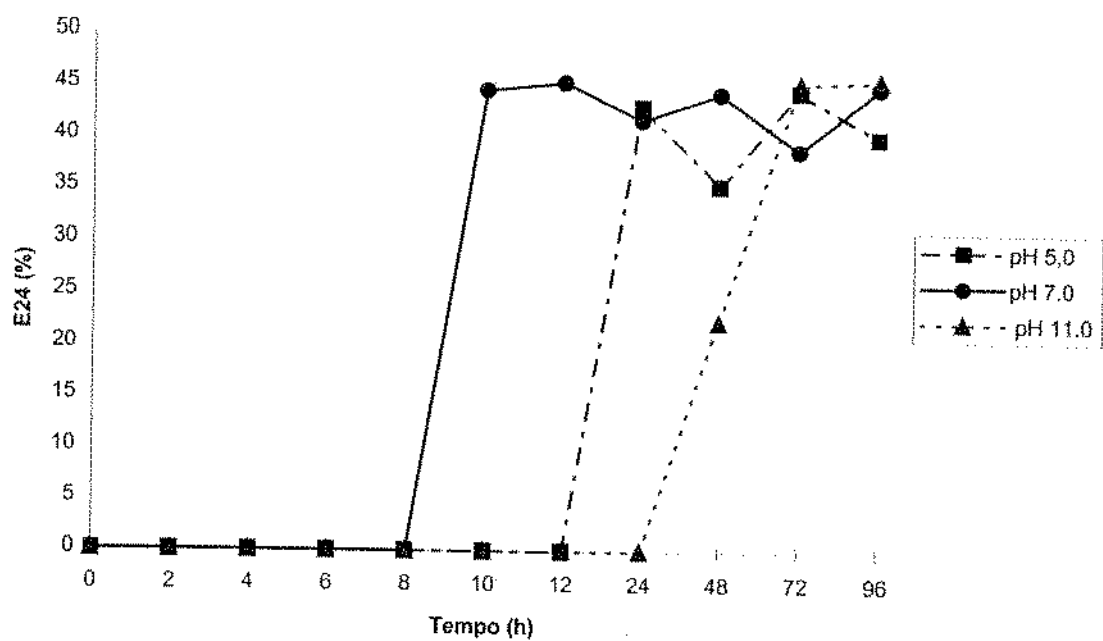


Figura 7 - Índice de emulsificação de óleo de soja em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

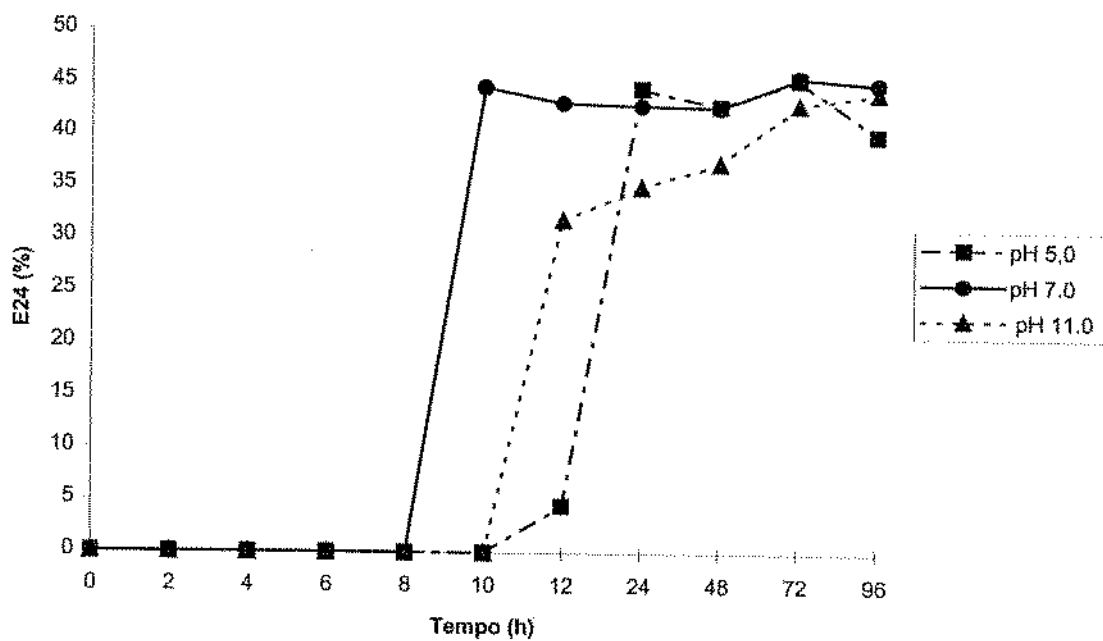


Figura 8 - Índice de emulsificação de Querosene em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

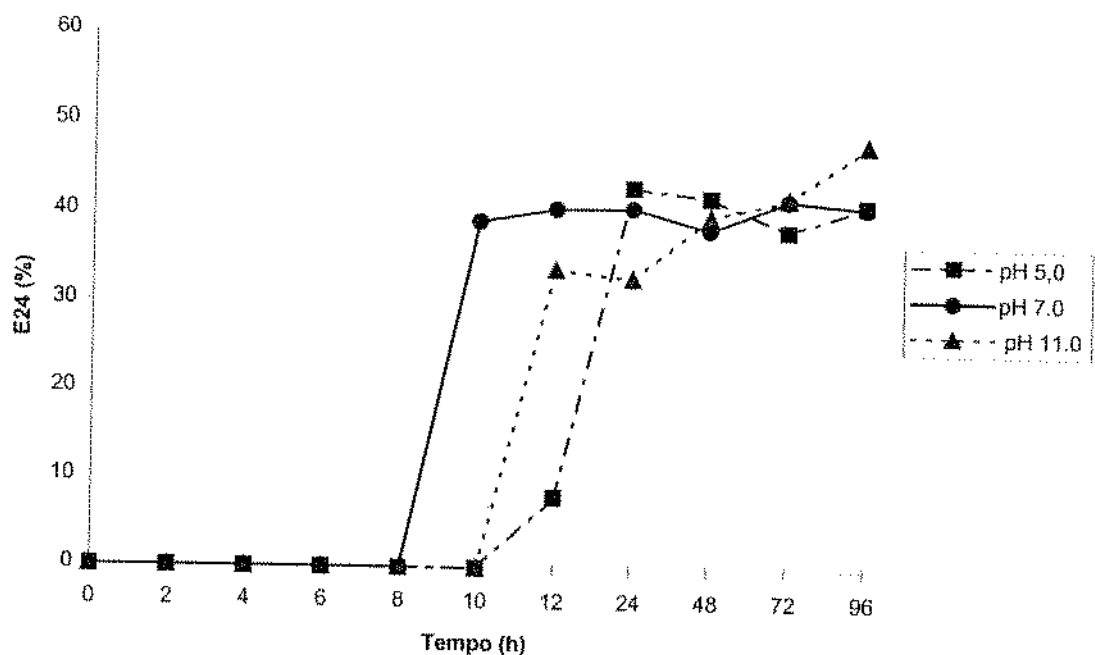


Figura 9 - Índice de emulsificação de Tolueno em sobrenadante da cultura da linhagem B1 cultivada em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

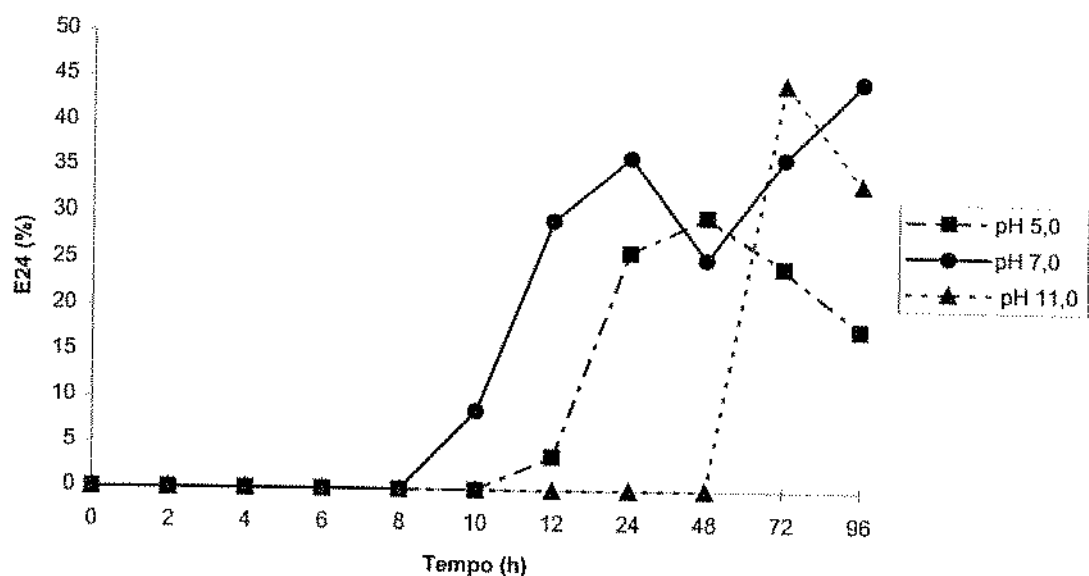


Figura 10 - Índice de emulsificação de Óleo Diesel em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

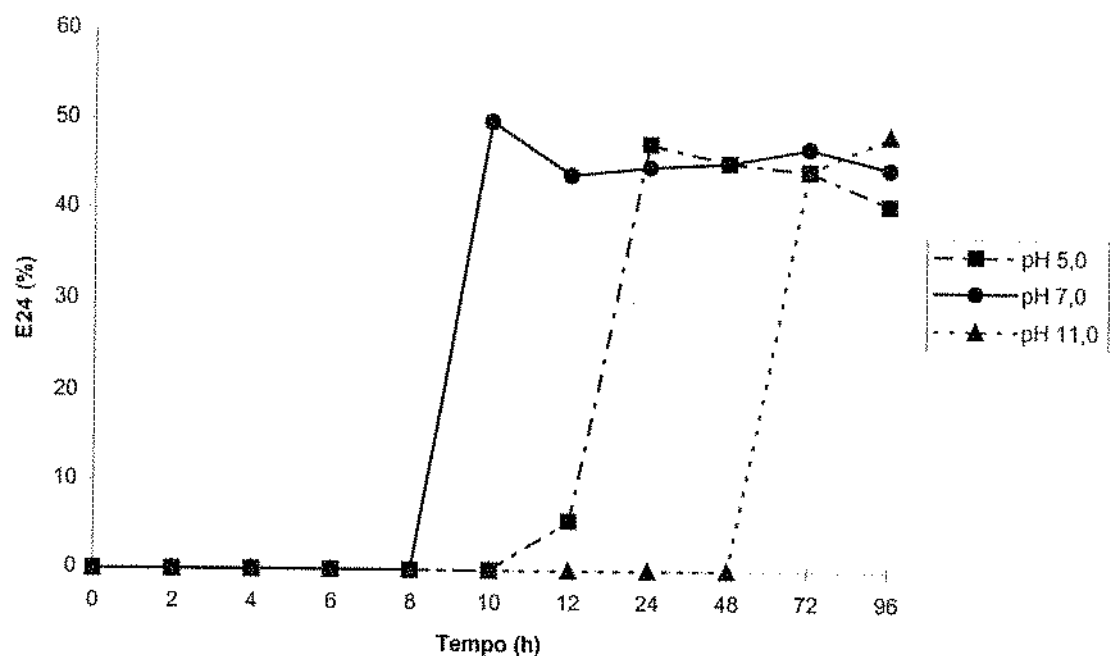


Figura 11 - Índice de emulsificação de Xileno em sobrenadante da cultura da linhagem B1 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

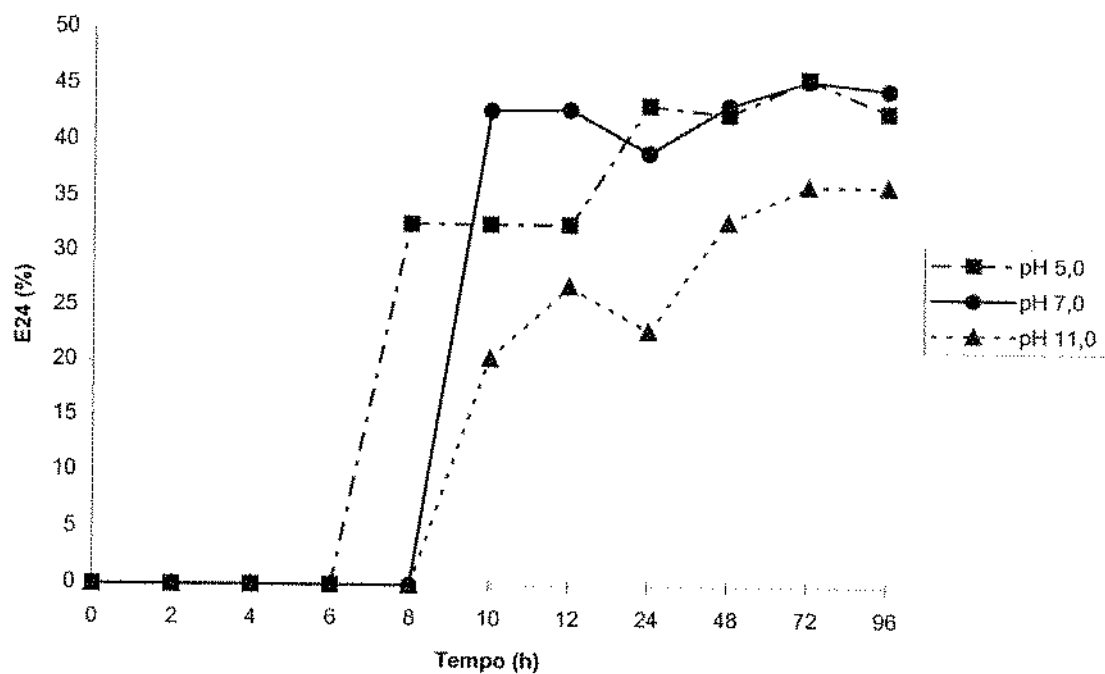


Figura 12 - Índice de Emulsificação de Óleo de Soja em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

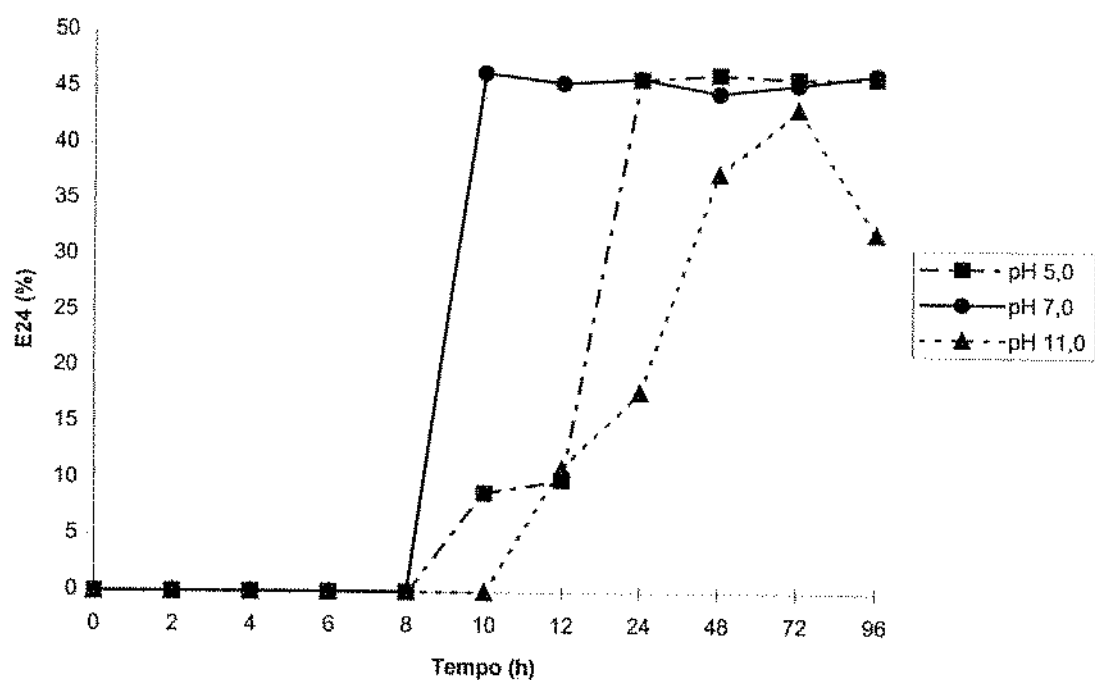


Figura 13 - Índice de Emulsificação de Querosene em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

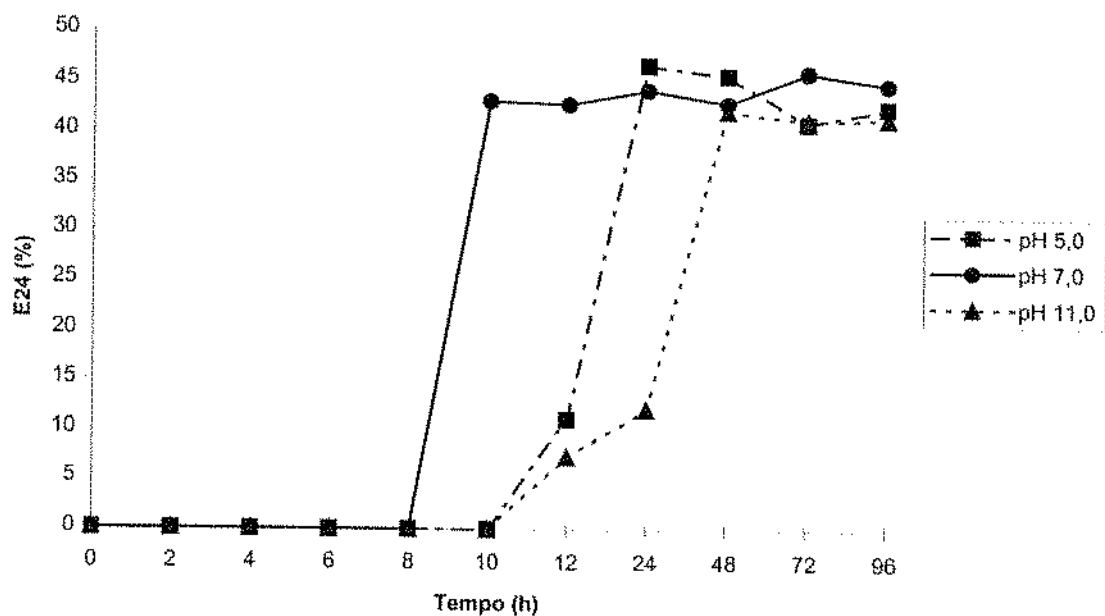


Figura 14 - Índice de Emulsificação de Tolueno em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

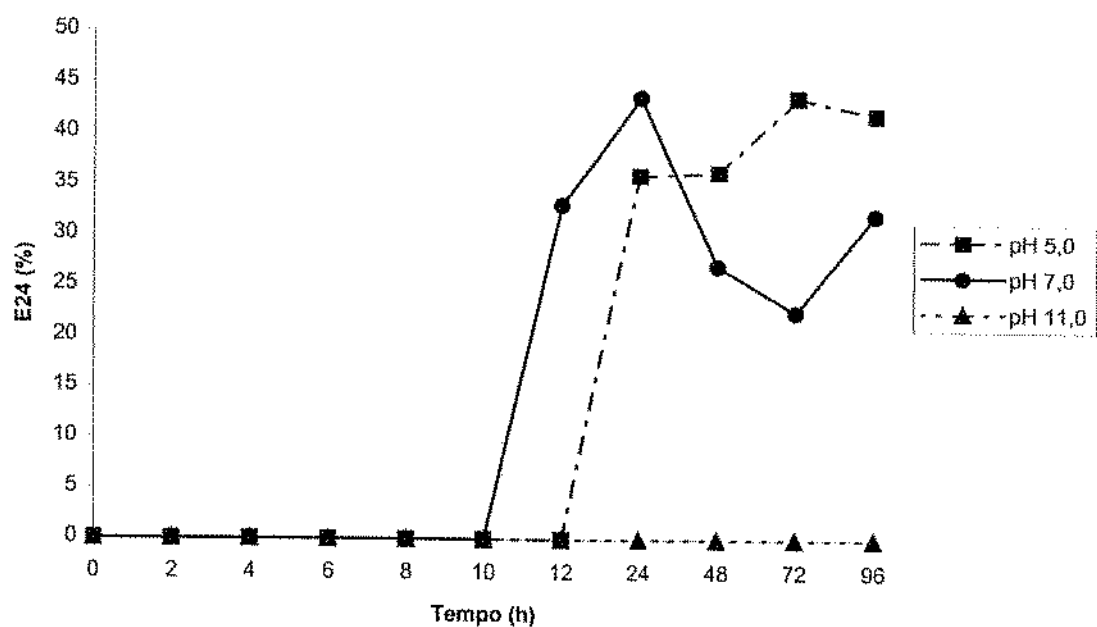


Figura 15 - Índice de Emulsificação de Óleo Diesel em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

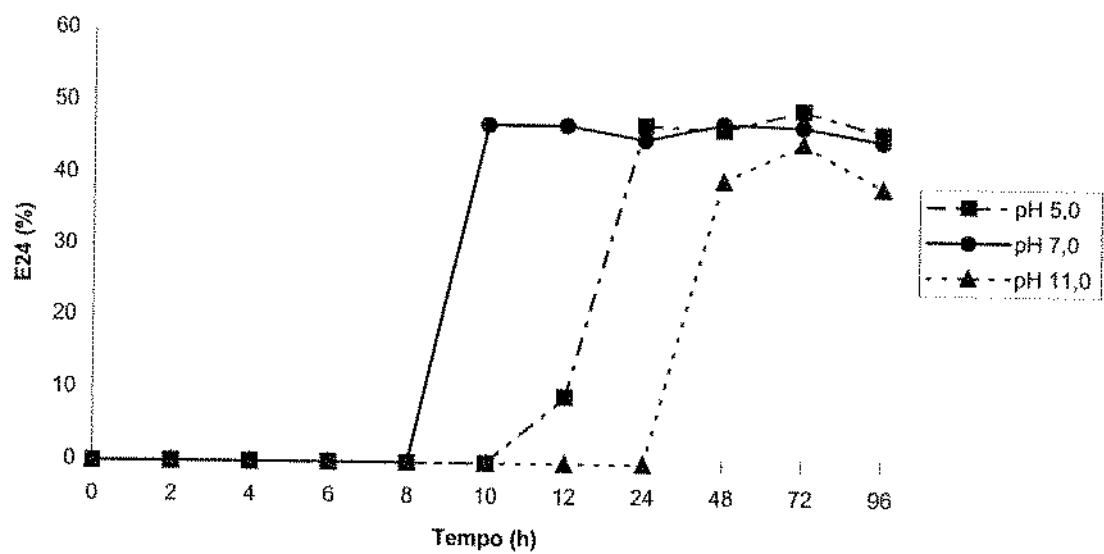


Figura 16 - Índice de Emulsificação de Xileno em sobrenadante da cultura da linhagem B9 em meio GYP em diferentes valores de pH inicial

Tabela 14 - Início da formação da emulsão máxima (GE++++) das linhagens B1 e B9 quando cultivadas em meio GYP em pH 5,0, 7,0 e 11,0 em relação aos compostos testados

LINHAGEM B1										
Óleo de soja			Querosene		Tolueno		Óleo diesel		Xileno	
pH	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio
5,0	24 h	40,84	24 h	43,42	24 h	41,27	24 h	24,54	24 h	44,58
7,0	10 h	43,39	10 h	44,00	10 h	40,42	12 h	44,85	10 h	45,00
11,0	72 h	45,45	72 h	44,14	48 h	43,40	72 h	44,54	72 h	46,6

LINHAGEM B9										
Óleo de soja			Querosene		Tolueno		Óleo diesel		Xileno	
pH	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio	Tempo início	E24 médio
5,0	24 h	44,54	24 h	46,00	24 h	44,04	24 h	39,5	24 h	47,52
7,0	10 h	43,28	10 h	45,72	10 h	44,07	12 h	31,66	10 h	46,70
11,0	72 h	36,36	72 h	37,69	72 h	41,39	96 h	0	48 h	41,09

COOPER & GOLDENBERG (1987) estudaram a produção de bioemulsificantes por *Bacillus* sp. IAF 343 e *Bacillus cereus* IAF346 a partir de fermentação de sacarose como fonte de carbono. O índice de emulsão E₂₄ foi medido pela mistura de 6 ml de querosene a 4 ml de fase aquosa (2g de bioemulsificante/l) em vortex por 2 min. Para o *Bacillus cereus* o valor de máximo de emulsificação 58% foi obtido após 30h de fermentação no pH 6,5 logo após o início da fase estacionária de crescimento, provocando um abaixamento da tensão superficial da água de 72 para 31 mN/m. A linhagem IAF 343 atingiu 60% de Índice de Emulsão (1,25 g/l de bioemulsificante) após 20 horas de fermentação em meio com pH controlado em 6,5, não ocasionando abaixamento de tensão superficial.

CAMERON *et al.*(1988) extraíram manoproteína da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* verificando a capacidade de emulsão pelo mesmo

método de COOPER & GOLDENGERG (1987), porém testando o índice de emulsão após uma hora da agitação do tubo. A concentração de 0,1% de manoproteína (p/v) foi obtida emulsão com querosene, óleo vegetal, óleo mineral, pentano, octano, hexadecano, etilacetato, clorofórmio, diclorometano, tolueno e xileno sendo índice de emulsão médio de 97% após 30 horas de cultivo.

ASHTAPUTRE & SHAH (1995) estudaram a produção de expolissacarídeo por *Sphingomonas paucimobilis* a partir da fermentação de sacarose como fonte de carbono. O expolissacarídeo foi capaz de emulsionar xileno, benzeno, 2 metilalfanaftaleno, hexadecano, hexano, querosene, óleo de castor, óleo de oliva, óleo de coco com índice de emulsão médio de 98% utilizando o método de COOPER & GOLDENGERG (1987) modificado.

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE GOTAS EMULSIONADAS (GE) E O ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Para análise do tipo de emulsão formada foi utilizado o método descrito por BRODERICK & COONEY (1981). Comparando os dados das Tabelas D1 à D10 no apêndice D e a Tabela 14 com as Figuras de 7 à 16 podemos observar que o número de gotas emulsionadas (GE) atinge o máximo (++++) quando o índice de emulsificação é máximo. Nas Figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22 temos fotos onde podemos observar claramente a formação máxima da emulsão pelo sobrenadante do cultivo da linhagem B9 em meio GYP em pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 horas e o número de gotas emulsionadas formadas pela emulsão com os compostos testados.

Foi possível observar nos tubos com GE máximo que a emulsão formada era tão consistente que o tubo podia ser invertido que a emulsão e a fase aquosa não escoavam. Este mesmo fato foi observado por BRODERICK & COONEY (1981) durante o estudo da desta metodologia de inspeção visual. A inspeção visual foi considerada por estes autores como o método mais reprodutivo, quando comparado a imobilização de gotas de óleo emulsionadas em gelatina com análise de frequência e tamanho das gotas emulsionadas, com o método de colapso da

emulsão pela medida do volume de querosene necessário para provocar o colapso da emulsão.

Foi observado que quanto maior o índice de emulsão maior o número de gotas emulsionadas e menor é o tamanho das gotas emulsionadas, portanto, maior a área interfacial total entre os dois líquidos imiscíveis. Segundo SHAW (1975) o aumento da área interfacial é uma característica dos bioemulsificantes.

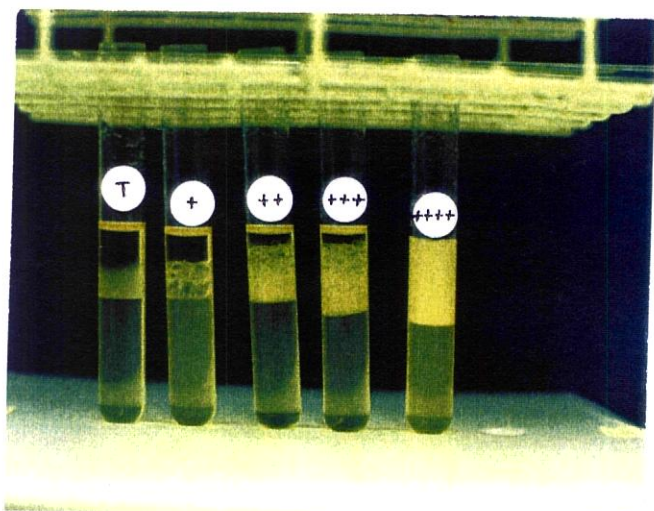


Fig. 17 - Escala do número de gotas emulsionadas (GE): +, ++, +++, +++++ e coluna emulsionada turva (T)

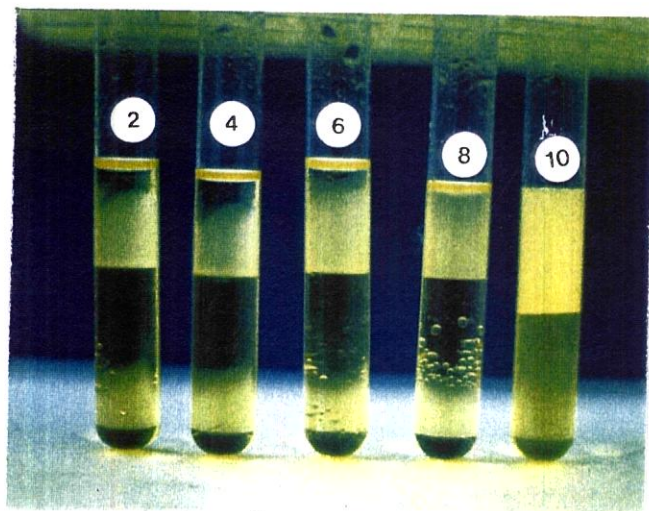


Fig.18-Óleo de soja emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8, 10h

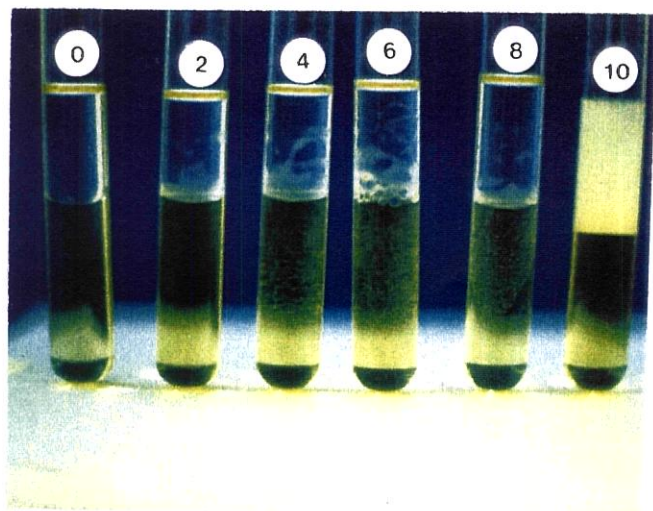


Fig.19 - Querosene emulsionada pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h

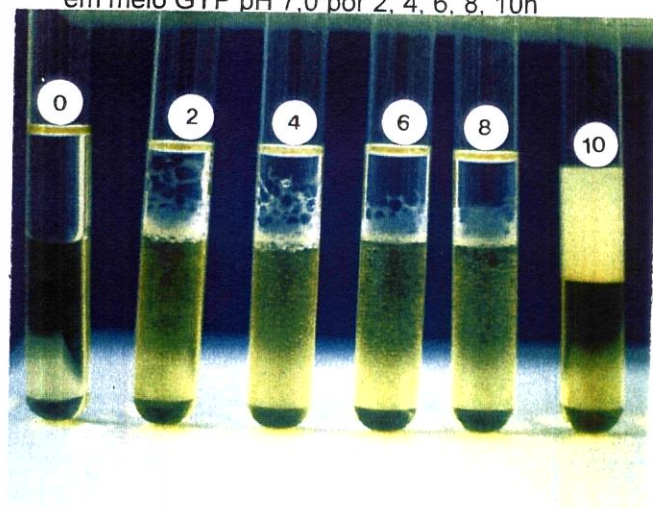


Figura 20 - Tolueno emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h

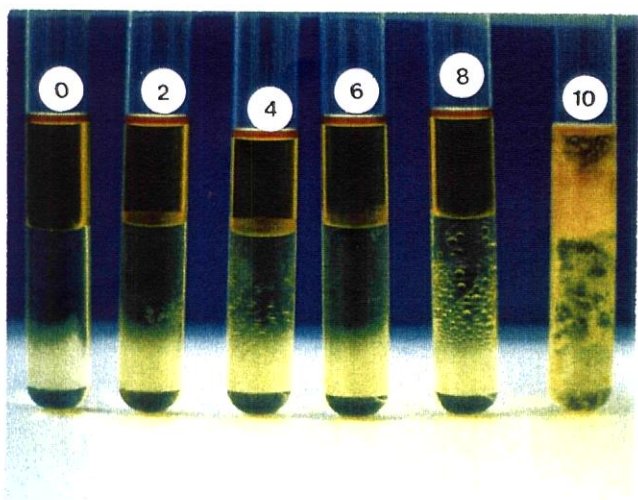


Fig. 21 - Óleo diesel emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h

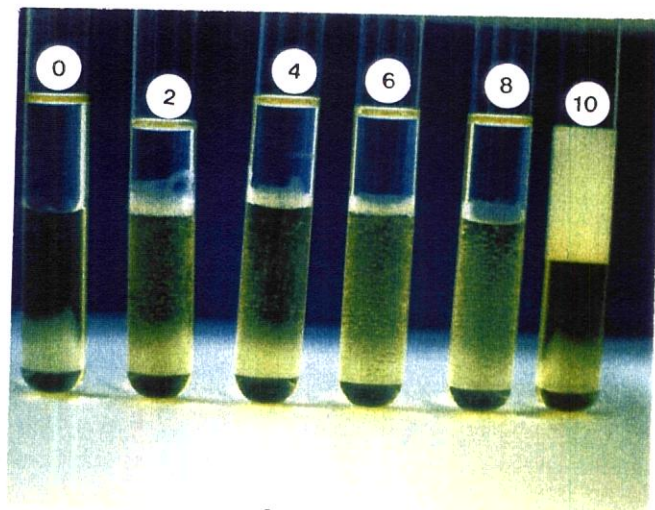


Figura 22 - Xileno emulsionado pelo sobrenadante da cultura da cepa B9 em meio GYP pH 7,0 por 2, 4, 6, 8 e 10 h

4.7 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DAS LINHAGENS B1 E B9

A atividade hemolítica positiva é observada quando há formação de halo incolor ao redor das colônias que crescem meio Agar Sangue. Tanto a linhagem B1 e B9 cresceram em meio Agar Sangue, porém não houve formação de halo incolor em volta das colônias, sendo negativa a atividade hemolítica.

Este método foi descrito por Wagner (1988) como um teste rápido para seleção de microrganismos produtores de glicolipídeos extracelulares solúveis em água. O método baseia-se na capacidade dos glicolipídeos provocarem lise das células vermelhas do sangue durante o crescimento dos microrganismos. Este mesmo método também foi utilizado por CARRILLO *et al.* (1996), como critério de seleção primário de microrganismos produtores de bioemulsificantes, onde das 492 linhagens isoladas, apenas 37 apresentaram atividade hemolítica. Estas linhagens com atividade hemolítica junto com outras 49 linhagens não hemolíticas foram testadas quanto a capacidade de reduzir a tensão superficial da água. Apenas 5 linhagens apresentaram atividade hemolítica e capacidade de reduzir a tensão superficial do meio.

De acordo com dados obtidos e com o relatado na literatura podemos supor que os bioemulsificantes produzidos pelas linhagens B1 e B9 não são glicolipídeos por não apresentarem atividade hemolítica.

4.8 REDUÇÃO DA DQO DO EFLUENTE EF2 PROVENIENTE DA INDÚSTRIA DE MARGARINA PELAS LINHAGENS B1 E B9

As linhagens B1 e B9 foram inoculadas em efluente EF₂ acrescido de sais (0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,1% KH₂PO₄, 0,3% NaNO₃, 0,1% extrato de levedura, 0,03%.peptona) estéril incubadas por 96 horas. De acordo com a Tabela 15 podemos observar que a redução média da DQO após 48 horas foi de 58% para a linhagem B9 com máxima redução após 96 horas de incubação (59,89%). A linhagem B1 apresentou redução de DQO de 63,66% após 96 horas de incubação.

Com estes resultados podemos supor que a produção de bioemulsificantes pode auxiliar na redução da DQO porém não foi possível estabelecer uma relação direta entre o índice de emulsificação e a capacidade de redução da DQO.

Os resultados deste estudo foram considerados bastante satisfatórios segundo o Laboratório de Tratamento de Efluentes da Gessy Lever, pois de acordo com o fluxograma do tratamento de efluentes (Figura 1) são necessárias várias etapas de tratamento físico-químicos antes que este chegue ao tanque de aeração, onde se dá o tratamento biológico dos efluentes. O tratamento biológico leva 150h para que se atinja uma redução de 95% de DBO em relação a mistura dos efluentes brutos ($EF_1 + EF_2$), que entram na estação de tratamento de efluentes. Existe uma relação de correspondência de redução de DQO e DBO que foi constatada pela Gessy onde a DBO corresponde a 61% da DQO. As linhagens B1 e B9 apresentam assim potencial para aplicação no tratamento biológico de efluentes.

TABELA 15 - Redução da DQO do EF_2 pela linhagem B9

Tempo (h)	DQO (mg oxigênio/l)	% de redução da DQO
0	2284	-
24	1339	41,37
48	1048	54,11
72	992	56,56
96	916	59,80

A degradação de resíduos industriais aquosos da extração de óleo de oliva por *Yarrowia lipolytica* (ATCC20255) foi estudada por DE FELICE (1997), obteve uma redução de 80% da DQO após 24horas de fermentação além de verificar a produção de proteína unicelular de 22,45 g/l.

4.9 IDENTIFICAÇÃO GÊNERO DAS LINHAGENS B1 e B9

As linhagens B1 e B2 isoladas do efluente EF2 proveniente da indústria de margarina apresentaram os melhores índices de emulsificação e foram identificadas quanto a gênero. De acordo com as características morfofisiológicas descritas pelo manual de Bergey (1986) e Mac Faddin (1980) as linhagens B1 e B2 foram identificadas como *Bacillus sp.* Os resultados dos testes de identificação realizados estão descritos na Tabela 16.

TABELA 16 - Características morfofisiológicas das linhagens B1 e B9

Característica	B1	B9
Forma	Bastonete	Bastonete
Gram	+	+
Formação de Esporo	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+

5. CONCLUSÕES

1 - Foram isoladas 111 cepas puras a partir dos efluentes da indústria de margarina e sabão sendo 79,28% bactérias, 10,81% fungos filamentosos e 9,91% leveduras. As linhagens B1 e B9 foram capazes de crescer e produzir bioemulsificantes quando cultivadas em meio contendo principal fonte de carbono glicose (meio GYP), óleo de soja (meio OS) e efluente da fábrica de margarina (meio EF₂).

2 - As linhagens B1 e B9 foram selecionadas como as melhores produtoras de bioemulsificantes, apresentando altos Índices de Emulsificação quando cultivadas em meio GYP ajustado a pH 7,0 após 10 horas de cultivo. Estas linhagens foram isoladas do efluente EF₂ proveniente da indústria de margarina e foram identificadas como *Bacillus sp.*

3 - As linhagens de *Bacillus sp* B1 e *Bacillus sp* B9 produziram bioemulsificantes capazes de emulsionar os compostos testados sendo estes aromáticos (tolueno e xileno), misturas de compostos alifáticos e cíclicos (querosene e diesel) e triglicerídeos (óleo de soja).

4 - As linhagens de *Bacillus sp* B1 e *Bacillus sp* B9 não apresentaram atividade hemolítica e os bioemulsificantes produzidos provocaram pequena redução da Tensão Superficial do meio de cultivo GYP.

5 - A linhagem de *Bacillus sp* B1 reduziu a DQO do efluente da fábrica de margarina (EF₂) em 58% após 48 horas de cultivo e o *Bacillus sp* B9 reduziu a DQO em 63,66% após 96 horas de cultivo no mesmo efluente.

6 - Os resultados acima indicam um potencial de utilização dos *Bacillus sp* B1 e *Bacillus sp* B9 para biorremediação e tratamento de efluentes industriais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHTAPUTRE, A. A., SHAH, A. K. . Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Shingomonas paucumobilis*. Word J. Microb. & Biotechnol., 11: 219-222, 1995.
- ATLAS, R. M. Microorganisms and petroleum pollutants. BioScience., 28(6): 387-391, 1978.
- BABU, P. S., VAIDYA, A. N., BAL, A. S., KAPUR, R., JUWARKAR, A., KHANNA, P. kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. Biotechnol. Letters, 18(3): 263-268, 1996.
- BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art (review). Acta Biotechnol., 15(3): 251-267, 1995
- BOBBIO, A. P., BOBBIO, F. Química do Processamento de Alimentos. São Paulo, ed. Varela, 151 p., 1992.
- BRODERICK, L. S. & COONEY, J.J. Emulsification of Hydrocarbons from Freshwater Ecosystems. Developments in Industrial Microbiol., 23, (39): 425-434, 1981.
- BROWN, M. J. & MOSES, V. Biosurfactants for petroleum recovery. Word Conference on Biotechnology for the Fats and Oils. in: JOACS., 64 (9): 202-205, 1988.
- CAMERON, D. R., COOPER, D. G., NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. App. Envr. Microb., 54(4): 1420-1425 jun., 1988.

- CARRILLO, P. G., MARDARAZ, C., PITTA-ALVAREZ, S. I., GIULIETTI, A. M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. World J. Biotechnol., 12: 82-84, 1996.
- CARVALHO, D. F. & DURRANT, L. R. Isolamento de microrganismos produtores de biosurfactantes. In: I Reunião nacional de microbiologia aplicada ao meio ambiente - Programas e resumos, Ed. Instituto de Química da UNICAMP, agosto, 1996, 61p.
- COOPER, D. G., ZAJIC, J. E. Surface-Active Compounds from Microorganisms. Adv. Appl. Microbiol., 26: 229- 253, 1980.
- COOPER, D. G., LISS, S. N., LONGAY, R., ZAJIC, J. E. Surface activity of *Micobacterium* and *Pseudomonas*. J. Ferment. Techn., 59(2): 97-101, 1981a.
- COOPER, D. G., MACDONALD, S. J., DUFF, B. KOSARIC, N. Enhanced production of surfactina from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. App. Environ. Microbiol., 42(3): 408-412, 1981b.
- COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G., Surface-ative agents from two *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol., 53(2): 224-229, Feb., 1987.
- DE FELICE, B., PONTECORVO, B., CARFAGNA, M. Degradation of waste olive mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. Acta Biotechnol., 17(3): 231-239, 1997.
- DUVNJAK, Z., COOPER, D. G., KOSARICK, N. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. Biotech. Bioeng., 24:165-175, 1982.
- FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Food Sci. & Techn., 3: 286-293, nov. 1992.
- GEERDINK, M. J., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., LUYBEN, K. C. A. M. Biodegradability of diesel oil. Biodegradation, 7: 73-81, 1996.

GERSON, D. F., ZIAJIC, J. E. Microbial surfactants. Proc. Biochem.,: 20-29, Jul.,1979.

GINKEL, C. G. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. Biodegradation, 7: 151-164, 1996.

GREENBERG, A. E., CLESCERI, L. S., ETON, A. D. Chemical oxygen demand, standard methods for the examination of water and waste water,: 5.1-5.5, 18 th ed.,1992.

GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O., FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. App. Environ. Microbiol.,48(2): 301-305, 1984.

GUTNICK, D. L., & SHABTAI, Y. Exopolysaccharide bioemulsifiers IN: KOSARIC, N., CAIRNS, W., Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant series vol. 25. New York, ed.Marcel Dekker Inc. 1987,342 p.

HARVEY, S., ELASHVILI,I., VALDES, J. J., KAMELY, D., CHAKRABARTY, A. M. Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial surfactant. Biotechnol., 8: 228-230, Mar., 1990.

HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. Biodegradation, 1: 107-119, 1990.

HOMMEL, R. K., HUSE, K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (torulopsis) apicola*. Biotech. Letters,15(8): 853-858, Aug.,1993.

HOMMEL, R. K., STIIWER, O., STUBER, W., HAFERBURG, D., KLEBER, H. P. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26:199-205, 1987.

HOROWITZ, S., GILBERT, J. N., GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactante produced by *Bacillus licheniformis* 86. J. Ind. Microbiol.,6: 243-248, 1990.

INOUE, S. Biosurfactants in cosmetic application. Word Conference on Biotechnology for the Fats and Oils. in: JOACS., 64 (9): 189-194, 1988.

JENNY, K., KÄPPELI, O., FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36(5): 5-13, 1991.

JOHNSON, V., SINGH, M., SAINI, V. S., ADHIKARI, D. K., SISTA, V., YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. Biotec. Letters, 14(6): 487-490, Apr., 1992.

KITAMOTO, D., HANEISHI, K., NAKAHARA, T., TABUCHI, T. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetables oils. Agric. Bio. Chem., 54(1): 37-40, 1990.

KOSARIC, N., CAIRNS, W., Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant series vol. 25. New York, ed. Marcel Dekker Inc. 1987, 342 p.

KUDO, S. Biosurfactants as food additives. Word Conference on Biotechnology for the Fats and Oils. In: JOACS., 64 (9): 189-194, 1988.

LAYCOCK, M. V., HIDEBRAND, P. D., THIBAUT, P., WALTER, J. A., WRIGHT, J. L. C. Viscosin a Potent Peptidolipid Biosurfactant and Phytopathogenic Mediator Produced by a Pectolytic Strain of *Pseudomonas fluorescens*. J. Agric. Food Chem., 39: 483-489, 1991.

LANG, S. & WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant series vol. 25. New York, ed. Marcel Dekker Inc. 1987, 342 p.

LIN, S., MINTON, M. A., SHARMA, M. M., , GEORGIU, G. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* JF -2. Appl. Environ. Microbiol., 60(11): 31-38, Jan. 1994.

MACFADDIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2 ed. Baltimore: Williams & Williams, 1980.

MERCADE, M. E., MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by products for biosurfactant production. JAOCS, 71(1): 61-64, Jan.,1994.

MORRISON, R., BOYD, R. Química Orgânica. 9ª edição. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. 1639 p., 1983.

MURIEL, J. M., BRUQUE, J. M. OLFAS, J. M., SANCHES, A. J. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. Biotech. Letters, 18 (3): 235-240, 1996.

NAVON-VENEZIA, S., ZOZIN, Z., GOTTLIEB, A., LEGMANN, R., CARMELI, S., RON, E. Z., ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol., 61(9): 3240-32244, Sep.,1995.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M., LABBE, H., GRANGEMARD, I., DAS, B. C., PTAK, M., WALLACH, J., MICHEL, G. [Ala4] Surfactin, a Novel Isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR Spectroscopies. Europ. J. Biochem., 24 :89-96, 1996.

PRITCHARD, P. H., MUELLER, J. C., KREMER, F. V., GLASER, J. A. Oil spill biorremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. Biodegradation, 3: 315-335, 1992.

RAMBELOARISOA, E., RONTANI, J. , F., GIUSTI, G., DUVNJAK, Z., BERTRAND, J., C. Degradation of Crude Oil by a Mixed Population of Bacteria Isolated from Sea-Surface Foams. Marine Biol., 83,: 69-81, 1984.

ROSENBERG, E., LEGMAN, R., KUSHMARO, A., TAUBE, R., ADLER, E., RON, E. Petroleum Biorremediation- a Multiphase Problem. Biodegrad.3: 337-350, 1992.

SANTOS, C.,F. Seleção de Linhagem de Levedura Produtora de Biosurfactante e Estudo Fermentativo para sua Produção. Tese Mestrado, FEA, UNICAMP, 1997.

SHAW, D. J., Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies, 2ª edição, São Paulo, Ed. Edgard Blucher, 184p., 1975.

SINGH M. & DESAI J. D. Hydrocarbon emulsifying activity of bacterial strains: potential of *Arthrobacter paraffineus*. Current Science, 57(23):1307-1308, Dec., 1988.

SINGH, M., SAINI, V. S., ADHIKARI, D. K., DESAI, J. D., SISTA, V. R. Production of bioemulsifier by SPC-producing strain of *Candida Tropicalis* during hydrocarbon fermentation. Biotech. Letters., 12(10): 743-746, 1990.

SYLDATK, C. & WAGNER, F. Production of biosurfactants. in: Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant series vol. 25. New York, ed. Marcel Dekker Inc. 1987, 342 p.

SKIPINA, I. M., CHIRKO, E. P., OFITSEROV, E. N. Biodegradation of nonionic surfactants based PEG in *Pseudomonas mendocina* VKM B-1729. Appl. Biochem. Microbiol., 34(1): 51-56, 1998.

TAN, H., CHAMPION, J. T., ARTIOLA, J. F., BRUSSEAU, M. L., MILLER, P.M. Cadmium recovery by bioemulsifier from *Pseudomonas aeruginosa*. Environm. science technology, 28: 200-207, 1994.

VAN DYKE, M. I., LEE, H., TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. Biotech. Adv., 9: 241-252, 1991.

VAN DYKE, M. I., COUTURE, P., BRAUER, M., LEE, H., TREVORS, J. T. *Pseudomonas aeruginosa* UGE rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbil., 39:1071-1078, 1993.

WAGNER, F. Strategies for Biosurfactant Production. Word Conference on Biotechnology for the Fats and Oils. In: JOACS., 64 (9): 189-194, 1988.

ZHANG, Y. & MILLER, R. M. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. Appl. Environm. Microbiol., 61(6): 2247-2251, Jun, 1995.

ZOBELL, C.E. Action of Microorganisms on Hydrocarbons. Bacteriology Review. 10,: 1-49, 1946.

APÊNDICE

Apêndice A - Dados das linhagens isoladas dos efluentes EF1, EF2, EF3 e EF4

TABELA A1 - Condições de isolamento, morfologia e coloração de Gram das bactérias isoladas do efluente EF1

Amostra	Meio	pH	Temp.	Forma	Gram
A1	EF1	5,0	37	coco	+
A2	EF1	11,0	37	coco	+
A3	NA	5,0	30	coco	-
A4	EF1	7,0	30	bastonete	+
A5	EF1	11,0	30	bastonete	+
A6	EF1	7,0	37	coco	+
A7	NA	5,0	37	bastonete	-
A8	NA	5,0	37	coco	+
A10	EF1	11,0	37	bastonete	+
A11	NA	5,0	30	coco	+
A13	NA	5,0	37	bastonete	+
A15	NA	5,0	30	bastonete	+
A16	EF1	7,0	30	bastonete	+
A17	NA	5,0	37	bastonete	+
A18	NA	5,0	37	bastonete	+
A19	EF1	7,0	37	bastonete	+
A20	NA	5,0	37	bastonete	+
A21	EF1	7,0	37	coco	+
A22	EF1	11,0	30	bastonete	-
A23	NA	5,0	30	bastonete	-
A24	EF1	7,0	37	bastonete	+
A25	NA	5,0	30	coco	+
A26	EF1	11,0	30	bastonete	+
A27	NA	5,0	37	bastonete	+

TABELA A2 - Condições de isolamento, morfologia e coloração de Gram das bactérias isoladas do efluente EF2

Amostra	Meio	pH	Temp.	Forma	Gram
B1	EF2	11,0	37	bastonete	+
B2	EF2	11,0	30	bastonete	+
B3	EF2	7,0	30	coco	+
B4	NA	7,0	37	bastonete	+
B5	EF2	11,0	30	bastonete	+
B6	NA	7,0	37	bastonete	+
B7	EF2	11,0	37	bastonete	+
B8	NA	7,0	37	bastonete	+
B9	EF2	11,0	37	bastonete	+
B10	EF2	7,0	30	coco	+
B11	EF2	11,0	30	bastonete	+
B13	EF2	11,0	30	bastonete	+
B14	EF2	11,0	37	bastonete	+
B15	EF2	11,0	37	bastonete	+
B16	EF2	11,0	30	bastonete	+
B17	EF2	11,0	37	bastonete	+
B18	EF2	7,0	30	bastonete	+

TABELA A3- Condições de isolamento, morfologia e coloração de Gram das bactérias isoladas do efluente EF3 e EF4

EF3					
Amostra	Meio	pH	Temp.(C)	Forma	Gram
C2	NA	5,0	30	coco	+
C3	NA	7,0	37	coco	+
C4	NA	5,0	37	bastonete	+
C5	NA	7,0	30	coco	+
C6	NA	7,0	37	bastonete	+
C7	EF3	7,0	30	bastonete	+
C8	EF3	7,0	30	bastonete	+
C9	NA	5,0	30	bastonete	+
C11	EF3	11,0	37	bastonete	+
C12	EM	7,0	37	bastonete	+
C13	NA	5,0	30	bastonete	+
C14	EM	7,0	30	bastonete	+
C15	EM	7,0	37	bastonete	+
C16	EF3	7,0	30	bastonete	+
C17	EF3	7,0	30	bastonete	+
EF4					
D1	EF	5,0	30	bastonete	+
D2	EF	11,0	37	bastonete	+
D3	EF	7,0	37	bastonete	+
D4	EF	7,0	30	bastonete	+
D5	EF	5,0	37	bastonete	+
D6	EM	7,0	30	bastonete	+
D7	EM	7,0	30	bastonete	+
D8	EF	5,0	37	bastonete	+
D9	EF	5,0	37	bastonete	+
D11	EM	7,0	30	bastonete	+
D13	EM	7,0	37	bastonete	+
D15	EF	5,0	30	bastonete	+
D16	NA	7,0	30	bastonete	+
D17	NA	7,0	30	coco	+
D20	NA	7,0	37	coco	+
D21	EF	7,0	30	bastonete	+
D22	EF	7,0	37	bastonete	+
D23	EF	5,0	37	bastonete	+
D24	EM	7,0	30	bastonete	+
D25	EF	11,0	37	bastonete	+
D26	NA	7,0	37	bastonete	+
D27	NA	7,0	30	bastonete	+
D28	EF	11,0	37	bastonete	+
D29	EF	7,0	30	bastonete	+
D30	EM	7,0	30	bastonete	+
D31	EM	7,0	30	bastonete	+
D32	EF	7,0	30	coco	+
D33	EF	7,0	30	bastonete	+
D34	NA	7,0	30	bastonete	+
D35	EF	11,0	30	coco	+
D36	EF	11,0	37	coco	-

TABELA A4 - Condições de isolamento dos fungos filamentosos e leveduras isolados dos efluentes EF1, EF2, EF3 e EF4.

EF1				
Amostra	Meio	pH	Temp.	Tipo
A9	NA	5,0	37	levedura
A12	EM	7,0	37	levedura
A14	EM	7,0	37	levedura
A28	EM	7,0	30	fungo
A29	EF1	11,0	30	fungo
A30	EM	7,0	37	fungo
EF2				
B12	EM	7,0	30	levedura
B13	EM	7,0	37	fungo
B14	EF2	7,0	30	fungo
EF3				
C1	NA	5,0	30	levedura
C18	EM	7,0	55	fungo
C19	EM	7,0	55	fungo
C20	EM	7,0	37	fungo
C21	EM	7,0	30	fungo
C22	EF3	7,0	30	fungo
C23	EM	7,0	30	fungo
EF4				
D10	EF4	7,0	55	levedura
D12	EM	7,0	30	levedura
D14	EM	7,0	37	levedura
D18	EM	7,0	30	levedura
D19	EM	7,0	30	levedura
D37	EM	7,0	30	fungo

TABELA B1 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D29 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO OS 1,5%					
	ÓLEO DE SOJA		QUEROSENE		TOLUENO	
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0	0	-	0
48	0	-	0	0	-	0
96	0	-	0	36,36	++	0,04
				28,30	+++	0
				18,18	+	0
				32,72	++++	0,25

Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO OS 3%					
	ÓLEO DE SOJA		QUEROSENE		TOLUENO	
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0,04	0	-	0,01
48	0	-	0,01	0	-	0,01
96	0	-	0,01	37,50	+++	0
				29,41	++++	0,04
				5,50	+	0
				7,14	++++	0,04

Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO OS 5%					
	ÓLEO DE SOJA		QUEROSENE		TOLUENO	
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,01	0	-	0,09
24	0	-	0,01	21,43	+	0
48	0	-	0,02	0	-	0,08
96	0	-	0,01	37,5	++++	0
				32,14	++	0,02
				0	-	0
				35,71	++++	0,01

Tempo (h)	MEIO DE CULTIVO GYP					
	ÓLEO DE SOJA		QUEROSENE		TOLUENO	
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	5,26	+++	0,06
24	0	-	0	36,36	+++	0,01
48	0	-	0	36,36	++++	0,01
96	40,00	++++	0,04	36,84	++++	0,04
				44,44	++++	0,07
				35,57	++	0,06
				45,45	++++	0,06

TABELA B2 - Índice de Emulsificação(E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem B4 em relação a: Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	31,50	++	0	0	-	0,08	0	-	0	17,90	+++	0,08
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0,01	0	-	0	33,30	++	0,06
48	0	-	0	11	+	0	0	-	0,07	0	-	0	11,11	+++	0,02
96	0	-	0,06	28,30	+	0	19,00	++	0,23	0	-	0	33,30	++++	0,13

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	17,90	++	0	11,30	++	0,18	0	-	0	9,00	++	0,12
24	0	-	0,07	9,30	++	0	9,00	++	0,06	0	-	0	9,00	++	0,05
48	0	-	0,07	11	+	0,06	0	-	0,22	0	-	0	5,50	++	0,20
96	0	-	0	0	-	0,07	9,00	++	1,10	0	-	0	17,54	+++	0,87

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	9,0	++	0	20,00	+++	0,14	0	-	0	22,20	++++	0
24	0	-	0,04	0	-	0	6,00	++	0,18	0	-	0	9,00	++	0,14
48	0	-	0,09	0	-	0,02	4,00	++	0,98	0	-	0	4,00	+	0,85
96	0	-	0	0	-	0	8,00	++	0,72	0	-	0	19,23	+++	0,63

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	27,30	++++	0,09	0	-	0,68	0	-	0,14	0	-	0
24	0	-	0	0	-	0,03	0	-	0,13	0	-	0,01	0	-	0
48	0	-	0,06	0	-	0,01	0	-	0,14	0	-	0,10	0	-	0,10
96	17,90	++	0,05	28,60	++++	0,01	38,50	++++	0,07	26,41	++++	0,03	26,41	++++	0,09

TABELA B3 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante do cultivo da linhagem D30 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Xileno e Vaselina

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,03	0	-	0,01	0	-	0,08	0	-	0,01	0	-	0,06
24	0	-	0,09	0	-	0,01	0	-	0,13	0	-	0,01	0	-	0,11
48	0	-	0,04	0	-	0,01	0	-	0,14	0	-	0,01	0	-	0,21
96	0	-	0	0	-	0,03	0	-	0,19	0	-	0,04	0	-	0,11

MEIO DE CULTIVO OS 3%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,13	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0,02	0	-	0	0	-	0,13	0	-	0	0	-	0
48	0	-	0,05	0	-	0,01	0	-	0,53	0	-	0	0	-	0
96	0	-	0,08	0	-	0	0	-	0,24	0	-	0	0	-	0

MEIO DE CULTIVO OS 5%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,09	0	-	0,03	0	-	0,18	0	-	0,03	0	-	0,20
24	0	-	0,08	0	-	0	0	-	0,09	0	-	0,01	0	-	0,08
48	0	-	0,13	0	-	0	0	-	0,92	0	-	0,02	0	-	0,92
96	0	-	0,13	0	-	0,20	0	-	0,19	0	-	0,01	0	-	0,25

MEIO DE CULTIVO GYP

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0,07	0	-	0,40	0	-	0,10	0	-	0,42
24	0	-	0	0	-	0,09	0	-	0,09	0	-	0,07	0	-	0,05
48	0	-	0	0	-	0,08	0	-	0,08	0	-	0,03	0	-	0,03
96	32,08	+	0,17	14,28	++++	0,16	39,62	+++	0,16	5,40	++++	0,27	27,27	++++	0,36

TABELA B4 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem D20 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,06	0	-	0	0	-	0,05	0	-	0,06	0	-	0,01
24	0	-	0,06	0	-	0,01	0	-	0,08	0	-	0,01	0	-	0,07
48	0	-	0,01	0	-	0,03	0	-	0,06	0	-	0	0	-	0,06
96	0	-	0	37,50	++++	0	10,18	+++	0,03	0	-	0	21,82	++++	0,06

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,07	0	-	0,01	0	-	0,08	0	-	0,11	32,72	+++	0,07
24	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,09	0	-	0	0	-	0,06
48	0	-	0,05	0	-	0	0	-	0,04	0	-	0	0	-	0,02
96	0	-	0	35,09	+++	0	27,77	++	0,06	0	-	0	0	-	0,03

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	14,28	+	0	0	-	0,11	0	-	0	7,27	+	0,11
24	0	-	0	3,64	+	0	0	-	0,09	0	-	0	33,33	++	0
48	0	-	0	30,90	+	0	5,70	++	0,03	0	-	0	8,70	+	0,05
96	0	-	0	31,58	+	0	18,50	++	0,07	-	-	0	26,79	++++	0,03

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	12,28	++++	0,04	1,92	++++	1,20	10,00	++++	0,36	0	-	0
24	0	-	0	16,07	++++	0,01	3,70	++++	0,16	12,5	++++	0,01	6,00	+++	0,15
48	0	-	0	43,85	++++	0,10	43,4	++++	0,25	46	++++	0	10,00	++++	0
96	42,59	+	0,90	43,85	++++	0,04	37,73	++++	0,18	32,14	++++	0,03	38,18	++++	0,10

TABELA B5 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem D13 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0	0	-	0,03	0	-	0	0	-	0,11
24	0	-	0,05	0	-	0	0	-	0,07	0	-	0	0	-	0,07
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,04	0	-	0	0	-	0,05
96	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0,025

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0,01	0	-	0,08	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0,22	0	-	0	0	-	0
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0,02	0	-	0
96	0	-	0	0	-	0,03	0	-	0	0	-	0,01	0	-	0

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,07	0	-	0,04	0	-	0,13
96	0	-	0	0	-	0	0	-	0,02	0	-	0,02	0	-	0

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,17	30,40	+	0,14	0	-	0,51	0	-	0	0	-	0,55
24	0	-	0,03	14,30	+++	0,01	0	-	0	0	-	0	0	-	0
48	14,3	+++	0	25,90	+	0,01	14,30	+++	0,19	8,80	++++	0	0	-	0
96	32,7	++	0,21	26,32	+	0,02	18,52	++	0,27	17,90	+	0	0	-	0,09

TABELA B6 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da Linhagem D19 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0,01	0	-	0,20	0	-	0,01	0	-	0,12
24	0	-	0,05	0	-	0,10	0	-	0,04	0	-	0,05	0	-	0,19
48	0	-	0,07	0	-	0,01	0	-	0,16	0	-	0,01	0	-	0,19
96	0	-	0,07	0	-	0,01	0	-	0,09	0	-	0,05	0	-	0,09

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,015	0	-	0,01	0	-	0,17	0	-	0,33	0	-	0,23
24	0	-	0,05	0	-	0,03	0	-	0,07	0	-	0,02	0	-	0,09
48	0	-	0,09	0	-	0,01	0	-	0,15	0	-	0,02	0	-	0,02
96	0	-	0,01	0	-	0,01	0	-	0,15	0	-	0,01	0	-	0,10

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,12	0	-	0,05	0	-	0,13	0	-	0,03	0	-	0
24	0	-	0,80	0	-	0,03	0	-	0,14	0	-	0,02	0	-	0,11
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,18	0	-	0	0	-	0,15
96	26,40	+	0,01	14,30	++	0	0	-	0,21	0	-	0	0	-	0,12

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,12	0	-	0,13	0	-	0,30	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0,12	0	-	0,04	0	-	0,25	0	-	0	0	-	0
48	0	-	0,13	10,72	++++	0,04	27,78	+	0,17	5,30	++++	0,17	20,00	++	0,04
96	0	-	0,06	32,14	+	0,03	37,73	+++	0,08	20,37	+	0,08	35,71	+++	0,11

TABELA B7 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem B12 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, e Vaselina Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%

Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,03	0	-	0,01	0	-	0,11	0	-	0,01	0	-	0,08
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0,07	0	-	0	0	-	0,07
48	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,06
96	0	-	0,03	0	-	0,01	0	-	0,03	0	-	0,01	0	-	0,09

MEIO DE CULTIVO OS 3%

Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,09	0	-	0,07	0	-	0,09	0	-	0,03	0	-	0,13
24	0	-	0,08	0	-	0,01	0	-	0,12	0	-	0,03	0	-	0,24
48	0	-	0,04	0	-	0,01	0	-	0,05	0	-	0,03	0	-	0,07
96	0	-	0,07	0	-	0	0	-	0,12	0	-	0,02	0	-	0,13

MEIO DE CULTIVO OS 5%

Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0,10	0	-	0,21	0	-	0,02	0	-	0,17
24	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,04	0	-	0	0	-	0,18
48	0	-	0,15	0	-	0,03	4,00	++	0,12	0	-	0,01	5,50	++	0,13
96	0	-	0,08	5,2	+	0	11,50	++	0,32	0	-	0,02	11,0	++	0,33

MEIO DE CULTIVO GYP

Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,05	9,30	++++	0,13	7,30	++++	0,38	0	-	0,70	0	-	0
24	0	-	0	7,40	++++	0,02	5,60	++++	0,34	0	-	0,05	0	-	0
48	0	-	0	8,0	++++	0	0	-	0,26	0	-	0,06	0	-	0,33
96	0	-	0,36	37,03	++++	0,05	0	-	1,07	0	-	0,04	21,80	++++	1,44

TABELA B8 -Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem A26 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0	0	-	0,27	0	-	0	0	-	0,12
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0,13	0	-	0	0	-	0,09
48	0	-	0,06	0	-	0,01	0	-	0,31	0	-	0,03	0	-	0,32
96	0	-	0	0	-	0	0	-	1,17	0	-	0	0	-	1,19

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,11	0	-	0	0	-	0,11	0	-	0	0	-	0,15
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0,59	0	-	0	0	-	0,30
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,30	0	-	0	0	-	0,50
96	0	-	0	0	-	0	0	-	1,04	0	-	0	0	-	0,89

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,19	0	-	0	0	-	0,36	0	-	0,05	0	-	0,17
24	0	-	0,04	0	-	0,01	0	-	0,09	0	-	0	0	-	0,13
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,82	0	-	0	0	-	0,58
96	0	-	0,08	0	-	0	0	-	1,06	0	-	0	0	-	0,88

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0,05	0	-	0,29	0	-	0,03	0	-	0
24	0	-	0	0	-	0,02	0	-	0,17	0	-	0,01	0	-	0
48	0	-	0	0	-	0,03	0	-	0,21	0	-	0,06	0	-	0
96	0	-	0,05	0	-	0,02	0	-	0,17	0	-	0,10	0	-	0,09

TABELA B9 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorvência (540 nm) do sobrenadante do cultivo da Linhagem D14 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,02	0	-	0	0	-	0,11	0	-	0	0	-	0,16
24	0	-	0,05	0	-	0,01	0	-	0,15	0	-	0	0	-	0
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,07	0	-	0	0	-	0
96	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,10	0	-	0,01	0	-	0,08

MEIO DE CULTIVO OS 3%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,15	0	-	0	0	-	0,24
24	0	-	0	0	-	0	0	-	0,13	0	-	0	0	-	0,05
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,37	0	-	0	0	-	0
96	0	-	0,03	0	-	0	0	-	0,27	0	-	0,03	0	-	0,34

MEIO DE CULTIVO OS 5%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0	0	-	0,27	0	-	0,03	0	-	0,19
24	0	-	0,01	0	-	0	0	-	0,16	0	-	0,01	0	-	0,16
48	0	-	0,07	0	-	0,01	0	-	0,39	0	-	0	0	-	0,35
96	0	-	0,04	0	-	0	0	-	0,1	0	-	0,01	0	-	0,15

MEIO DE CULTIVO GYP

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,25	9,60	+	0,07	0	-	0,41	0	-	0,05	0	-	0
24	20,0	+	0,03	17,60	++++	17,60	0	-	0,3	0	-	0,05	0	-	0
48	39,0	++++	0,01	15,80	++++	15,80	26,8	++++	0,17	0	-	0,01	0	-	0
96	35,0	+	0,04	17,06	+++	17,06	38,46	++	0,12	9,43	++	0,02	11,32	++	0,10

TABELA B11 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem D11 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0	0	-	0,05	0	-	0,01	0	-	0
24	0	-	0,15	0	-	0	0	-	0,13	0	-	0,01	0	-	0,11
48	0	-	0,09	0	-	0	0	-	0,11	0	-	0	0	-	0,11
96	0	-	0,35	0	-	0,01	0	-	0,15	0	-	0,01	0	-	0,13

MEIO DE CULTIVO OS 3%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
24	0	-	0,03	0	-	0	0	-	0,19	0	-	0,01	0	-	0,13
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,25	0	-	0	0	-	0,15
96	0	-	0,05	0	-	0	0	-	0,47	0	-	0	0	-	0,39

MEIO DE CULTIVO OS 5%

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,02	0	-	0	0	-	0,10	0	-	0	0	-	0,12
24	0	-	0,04	0	-	0	0	-	0,29	0	-	0	0	-	0,24
48	0	-	0	0	-	0	0	-	0,33	0	-	0	0	-	0,25
96	0	-	0,13	0	-	0	0	-	0,22	0	-	0	0	-	0,24

MEIO DE CULTIVO GYP

Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	0	-	0,09	0	-	0,45	0	-	0,15	0	-	0
24	0	-	0	3,60	++	0	11,54	+++	0,17	0	-	0,01	0	-	0
48	0	-	0	37,50	+++	0,05	34,00	++++	0,10	32,08	++	0,10	0	-	0
96	47,17	++++	0,79	45,45	++++	0,02	46,00	++++	0,38	39,28	++	0,02	44,64	++++	0,30

TABELA B12 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem B1 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0,04	28,85	+	0,005	13,21	+	0,05	0	-	0,02	29,41	++++	0,08
24	0	-	0	45,45	++++	0	41,51	++++	0,13	40,00	+++	0,02	39,29	++++	0,10
48	0	-	0,01	36,36	++	0,010	34,55	++++	0,06	9,00	+	0,01	35,71	+++	0,03
96	0	-	0,07	37,03	+++	0	42,60	++++	0,05	0	-	0,01	36,36	++++	0,30

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	36,36	+++	0	28,85	+++	0,11	0	-	0	40,00	++++	0
24	0	-	0	40,00	++++	0	42,30	++++	0,19	0	-	0	45,45	++++	0,07
48	0	-	0,03	35,71	+++	0	39,62	+++	0,05	0	-	0,07	36,36	++++	0,03
96	0	-	0	35,71	++++	0	40,00	++++	0,06	0	-	0	45,45	++++	0,06

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	36,36	+++	0	34,61	++++	0,21	0	-	0	36,36	++++	0,15
24	0	-	0	40,00	++++	0	40,00	++++	0,13	0	-	0	45,45	++++	0,05
48	0	-	0,05	36,36	++++	0	40,00	++++	0,03	0	-	0,07	40,00	++++	0,23
96	0	-	0,01	39,29	++++	0	42,00	++++	0,04	0	-	0	40,00	++++	0

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	35,71	++++	0,13	0	-	0,30	36,36	++++	0,09	0	-	0
24	0	-	0	42,10	+++	0	44,44	++++	0	36,36	+	0	0	-	0
48	0	-	15,00	43,00	++++	0,01	40,00	++++	0,06	9,00	+	0,11	27,27	++++	0,11
96	44,44	++++	0,37	45,45	++++	0,02	46,29	++++	0,11	44,64	++++	0,02	45,45	++++	0,09

TABELA B13 - Índice de Emulsificação (E24), gotas emulsionadas (GE) e absorbância (540 nm) do sobrenadante da cultura da linhagem B9 em relação a Óleo de soja, Querosene, Tolueno, Vaselina e Xileno

MEIO DE CULTIVO OS 1,5%															
Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	3,70	T	0,02	32,14	++	0,04	0	-	0,15	0	-	0,05	26,78	++++	0,08
24	3,70	T	0,03	16,66	+++	0,03	0	-	0,14	0	-	0,03	28,07	++++	0,75
48	0	-	0,35	30,36	++	0,01	19,64	++	0,18	0	-	0,03	39,28	++++	0,13
96	0	-	0,05	36,36	++++	0,01	0	-	0,22	0	-	0,01	23,63	++++	0,28

MEIO DE CULTIVO OS 3%															
Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	32,14	++	0	5,45	+++	0	0	-	0	0	-	0
24	10,71	T	0,03	38,59	++++	0,04	44,64	+++	0,13	0	-	0,05	43,63	+++	0,12
48	0	-	0,02	33,33	++	0,02	33,92	+++	0,03	0	-	0,15	33,92	+++	0,07
96	0	-	0,22	0	-	0,04	25,00	+++	0,09	0	-	0,03	25,00	++++	0,55

MEIO DE CULTIVO OS 5%															
Tempo (h)	ÓLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	7,20	T	0,05	29,09	++	0,02	7,40	++	0,25	0	-	0,035	33,93	++	0,19
24	0	-	0,08	0	-	0,03	0	-	0,25	0	-	0,03	10,71	++	0,09
48	0	-	0,04	3,57	+	0,01	0	-	0,09	0	-	0,02	12,50	++	0,05
96	0	-	0,04	39,28	++++	0,01	42,59	++++	0,11	28,85	+	0,25	44,64	++++	0,07

MEIO DE CULTIVO GYP															
Tempo (h)	OLEO DE SOJA			QUEROSENE			TOLUENO			VASELINA			XILENO		
	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS	E24	GE	ABS
10	0	-	0	37,50	++++	0,13	10,90	+++	0,40	0	-	0,11	0	-	0
24	0	-	0	10,71	++++	0,09	35,71	++++	0,13	0	-	0,08	0	-	0
48	0	-	0	12,55	++++	0,08	27,77	++	0,15	30,90	+	0,08	0	-	0
96	45,28	++++	0,15	43,86	++++	0,07	47,27	+++	0,09	45,45	++++	0,07	47,27	++++	0,05

Anexo C - Dados referentes a tensão superficial.

TABELA C1 - Influência do pH do meio GYP na produção de bioemulsificante pela linhagem B1 na redução da tensão superficial (TS-mN/m)

Tempo (h)	pH 5,0	pH 7,0	pH 11,0
0	50,73	48,66	51,85
2	45,53	44,73	46,65
4	46,14	48,41	43,76
6	46,40	47,00	45,16
8	46,52	45,94	40,75
10	45,98	42,02	45,66
12	45,50	40,98	44,58
24	40,90	40,75	46,36
48	41,5	39,71	42,71
72	40,76	40,53	39,09
96	41,31	40,08	37,76

Obs: Tensão superficial da água - 72 mN/m

TABELA C2 - Influência do pH do meio GYP na produção de bioemulsificante pela linhagem B9 na redução da tensão superficial (TS-mN/m)

Tempo (h)	pH 5,0	pH 7,0	pH 11,0
0	50,73	48,66	51,94
2	46,80	48,82	46,71
4	45,24	44,95	44,87
6	44,35	41,48	43,25
8	46,52	45,25	42,00
10	47,19	48,00	41,54
12	46,37	40,35	47,13
24	46,38	42,49	46,67
48	40,27	40,35	41,06
72	40,34	41,35	44,25
96	41,53	41,90	48,34

Obs: Tensão superficial da água - 72 mN/m

Anexo D - Dados referentes a Influência do pH no E24 e GE

TABELA D1 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a Óleo de Soja quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH 5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	-	0	-	0	-
4	0	-	0	-	0	-
6	0	-	0	-	0	-
8	0	-	0	-	0	-
10	0	-	44,64	++++	0	-
12	0	-	45,45	++++	0	-
24	43,12	++++	41,82	++++	0	-
48	35,45	++++	44,44	++++	22,33	+
72	44,64	++++	38,88	++++	45,45	++++
96	40,18	++++	45,12	++++	45,79	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionadas: +, ++, +++, ++++

TABELA D2 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a Querosene quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH 5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	p	0	p	0	-
4	0	p	0	p	0	-
6	0	p	0	p	0	-
8	0	p	0	p	0	-
10	0	p	44,64	++++	0	-
12	4,50	++++	43,13	++++	31,81	++
24	44,54	++++	42,86	++++	35,00	++
48	42,85	++++	42,72	++++	37,27	++
72	45,45	++++	45,61	++++	42,98	+++
96	40,00	++++	45,05	++++	44,14	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionadas: +, ++, +++, ++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D3 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a Tolueno quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH 5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	p	0	p	0	-
4	0	p	0	p	0	-
6	0	p	0	p	0	-
8	0	p	0	p	0	-
10	0	p	39,28	++++	0	-
12	8,10	+++	40,77	++++	33,96	+++
24	43,14	++++	40,91	++++	33,00	+++
48	42,15	++++	38,53	++++	40,00	++++
72	38,46	++++	41,90	++++	42,06	++++
96	41,35	++++	41,18	++++	48,15	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionadas: +, ++, +++, ++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D4 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a Óleo diesel quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH 5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	-	0	-	0	-
4	0	-	0	-	0	-
6	0	-	0	-	0	-
8	0	-	0	-	0	-
10	0	-	8,70	p	0	-
12	3,70	++++	29,56	++++	0	-
24	26,13	++++	36,36	++++	0	-
48	30,00	++++	25,45	++++	0	-
72	24,54	++++	36,36	++++	44,54	++++
96	17,85	++++	44,85	++++	33,62	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionadas: +, ++, +++, ++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D5 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B1 em relação a Xileno quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH 5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	p	0	p	0	-
4	0	p	0	p	0	-
6	0	p	0	p	0	-
8	0	p	0	p	0	-
10	0	p	45,00	++++	0	-
12	5,60	+++	44,04	++++	0	-
24	47,61	++++	44,95	++++	0	-
48	45,45	++++	45,45	++++	0	-
72	44,54	++++	46,00	++++	44,54	++++
96	40,74	++++	44,85	++++	48,65	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionadas: +, ++, +++, ++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D6 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a Óleo de soja quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	-	0	-	0	-
4	0	-	0	-	0	-
6	0	-	0	p	0	-
8	32,72	+	0	p	0	-
10	32,72	+	43,00	++++	20,37	+
12	32,72	+	43,11	++++	27,10	+
24	43,51	++++	39,29	++++	23,00	+
48	42,73	++++	43,52	++++	33,03	++
72	45,94	++++	45,80	++++	36,36	++++
96	42,98	++++	45,00	++++	36,36	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionas: +, ++, +++, +++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D7 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a Querosene quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	p	0	p	0	-
4	0	p	0	p	0	-
6	0	p	0	p	0	-
8	0	p	0	p	0	-
10	8,77	+++	46,42	++++	0	-
12	10,00	+++	45,53	++++	11,00	+
24	45,87	++++	45,95	++++	17,85	++
48	46,29	++++	44,64	++++	37,50	+++
72	45,94	++++	45,45	++++	43,24	++++
96	46,02	++++	46,36	++++	32,14	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionas: +, ++, +++, +++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D8 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a Tolueno quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	p	0	p	0	-
4	0	p	0	p	0	-
6	0	p	0	p	0	-
8	0	p	0	p	0	-
10	0	p	43,13	++++	0	-
12	11,11	+	42,85	++++	7,27	+
24	46,78	++++	44,34	++++	12,12	++
48	45,79	++++	42,99	++++	42,20	+++
72	41,00	++++	46,15	++++	41,28	++++
96	42,59	++++	44,95	++++	41,50	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionas: +, ++, +++, ++++

(p) Gotas aderidas a parede

TABELA D9 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a Óleo diesel quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	-	0	-	0	-
4	0	-	0	-	0	-
6	0	-	0	-	0	-
8	0	-	0	-	0	-
10	0	-	0	p	0	-
12	0	-	33,03	++++	0	-
24	36,03	++++	43,63	++++	0	-
48	36,36	++++	27,03	++++	0	-
72	43,63	++++	22,52	++++	0	-
96	42,00	++++	32,11	++++	0	-

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

TABELA D10 - Índice de Emulsão (E24) e Gotas Emulsionadas (GE) da linhagem B9 em relação a Xileno quando cultivada em meio GYP em diferentes pHs

Tempo (h)	E24 pH5,0	GE	E24 pH 7,0	GE	E24 pH 11,0	GE
0	0	-	0	-	0	-
2	0	p	0	p	0	-
4	0	p	0	p	0	-
6	0	p	0	p	0	-
8	0	p	0	p	0	-
10	0	p	47,27	++++	0	-
12	9,25	+	47,27	++++	0	-
24	47,36	++++	45,37	++++	0	-
48	46,78	++++	47,66	++++	39,60	++++
72	49,54	++++	47,27	++++	44,95	++++
96	46,42	++++	45,37	++++	38,73	++++

(-) Não houve formação de gotas emulsionadas

(+) Escala do número de gotas emulsionadas: +, ++, +++, ++++

(p) Gotas aderidas a parede