



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**MARIA ANDREZA BEZERRA CORREIA**

**OTIMIZAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO DE  
QUEROSENE EM ÁGUA DO MAR POR  
*Candida lipolytica* UCP 0988**

Recife, 2014

**MARIA ANDREZA BEZERRA CORREIA**

**OTIMIZAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO DE  
QUEROSENE EM ÁGUA DO MAR POR  
*Candida lipolytica* UCP 0988**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

**Área de Concentração:**

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia e Meio ambiente.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque.

**Recife, 2014**

C824o

Correia, Maria Andreza Bezerra.

Otimização de biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 / Maria Andreza Bezerra Correia, 2014.

145 f. : il.

Orientador: Clarissa Daisy da Costa Albuquerque.

Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2014.

1. Biodegradação. 2. Água do mar - Tratamento. 3. *Candida lipolytica*. 4. Biossurfactantes. I. Título.

CDU 628.16

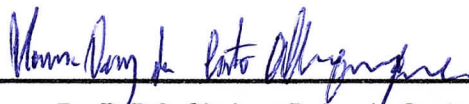
Pollyanna Alves - CRB/4-1002

**OTIMIZAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO DE  
QUEROSENE EM ÁGUA DO MAR POR**

*Candida lipolytica* UCP 0988

**MARIA ANDREZA BEZERRA CORREIA**

**Examinadores:**



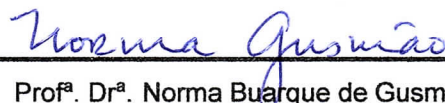
---

Prof.ª Dr.ª. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP/PE  
(orientadora)



---

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP/PE



---

Prof.ª Dr.ª. Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco – (UFPE)

*Aquela que estará sempre ao meu lado em  
todos os momentos, à minha família.*

*"A razão cardeal de toda a superioridade humana é sem dúvida a vontade. O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis."*

*(Texto atribuído a José de Alencar)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte infinita de bondade e amor pela oportunidade dada.

À minha família, a meu pai Manoel José Bezerra e a minha mãe Josefa Ana Bezerra, pelas lições e por ter me apoiado sempre, meus irmãos e minhas irmãs pela torcida, e ao meu esposo Thaddeus Marinho Correia e filho Thalles Bezerra Correia que me encorajaram e apoiam, e a todos que torceram e incentivaram nesta conquista.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque por tudo, pela confiança e sábios conselhos que levarei para vida toda.

Aos professores do Mestrado em Desenvolvimentos de Processos Ambientais Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Elesbão, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kaoru Okada e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Amorim.

As colegas, Brindize Lima, Márcia Muniz e Nadielly Andrade Silva que estiveram sempre comigo trabalhando e aprendendo, e a todos que conheci durante este percurso.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Alves da Silva por seu apoio durante as disciplinas e trabalhos desenvolvidos e pela participação na banca de defesa.

À professora Dr<sup>a</sup>. Norma Buarque de Gusmão pela participação na banca de defesa;

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), pela excelência nas áreas de pesquisa e ensino.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	v
SUMÁRIO .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
CAPÍTULO 1 .....	01
1.1 Introdução .....	02
1.2 Objetivos .....	04
1.2.1 Objetivo Geral .....	04
1.2.2 Objetivos Específicos .....	04
1.3 Revisão da Literatura .....	05
1.3.1 Petróleo .....	05
1.3.2 Querosene .....	06
1.3.3 Poluição por hidrocarbonetos do petróleo em ambiente marinho .....	07
1.3.4 Remoção de hidrocarbonetos do petróleo em ambiente marinho .....	10
1.3.5 Biorremediação.....	12
1.3.6 Surfactantes.....	13
1.3.7 Biossurfactantes.....	17
1.3.8. Biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo .....	19
1.3.9 Leveduras Ascomicetas utilizadas em Biotecnologia .....	22
1.3.10 <i>Yarrowia lipolytica</i> ( <i>Candida lipolytica</i> ) .....	23
1.3.11 Otimização de Processos de Biodegradação .....	25
1.4 Referências .....	28
CAPÍTULO 2 .....	41
Otimização de biodegradação de querosene e produção de biossurfactante por <i>candida lipolytica</i> ucp 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina .....	42
CAPÍTULO 3 .....	76
Considerações finais .....	77
ANEXOS .....	78
Comprovante de Submissão artigo a Revista Bioresource Technology .....	78
Normas da Revista Bioresource Technology .....	80
Artigo submetido à Revista Bioresource Technology .....	94



## LISTA DE FIGURA

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 Classificação geral dos surfactantes baseada na carga presente nas extremidades dos surfactantes. não-iônico (polioxietileno sorbitano), catiônico (brometo de cetil trimetil amônio, CTAB), aniônico (dodecil sulfato de sódio, SDS) e anfotérico (cocoamidopropil betaína) (SOEMO, 2013)..... 14
- Figura 2 Resposta da tensão superficial na interface ar-água com o aumento da concentração de surfactantes (SOEMO, 2013) ..... 16

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Perfis cinéticos de tensão superficial, pH, salinidade e concentração mássica total para os 8 ensaios (● Ensaio 1, ○ Ensaio 2, ▼ Ensaio 3, △ Ensaio 4, ■ Ensaio 5, □ Ensaio 6, ◆ Ensaio 7 e ◇ Ensaio 8) e a média da triplicata do ponto central (▲ Média dos Ensaios 9, 10 e 11) do planejamento central composto..... 72
- Figura 2 Gráficos de Superfícies de Resposta mostrando - com 360 h- os efeitos das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre: (a) Tensão Superficial, (b) pH, (c) Salinidade e (d) Concentração Mássica Total..... 73
- Figura 3 Biodegradação de Querosene em Água do Mar com 360 h: (a) AMQ-CESS- controle abiótico, sem sais nutrientes adicionais, consistindo de água do mar e querosene, (b) AMQ-PC- ensaio biótico, realizado em condições otimizadas, consistindo de inóculo, água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais, (c) AMQ-CECS- controle abiótico consistindo de água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais, (d) ADQ-CESS- controle abiótico, sem sais nutrientes adicionais, consistindo de água destilada e querosene, e) ADQ-PC controle biótico, consistindo de inóculo, água destilada, querosene e sais nutrientes adicionais e (f) ADQ-CECS- controle abiótico consistindo de água destilada, querosene e sais nutrientes adicionais ..... 74
- Figura 4 Biodegradação de Querosene em Água do Mar: (a) Perfis cinéticos do pH (◇), da tensão superficial (△), da salinidade (□) e da concentração mássica total (○) para o ensaio realizado em condições otimizadas (AMQ-PC), (b) Perfil cinético da tensão superficial (△), pH (◇), salinidade (□) e concentração mássica total (○) para o controle estéril consistindo de água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais (AMQ-CECS) . ..... 75

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 1

Tabela 1	Porcentagem de impurezas no querosene (FISQP, 2011) .....	07
Tabela 2	Micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo (SINGH, 2013).....	18
Tabela 3	Principais espécies de leveduras produtoras de biossurfactantes (FONTES 2008) .....	20

## CAPÍTULO 2

Tabela 1	Níveis e intervalos experimentais das variáveis independentes do planejamento composto central .....	67
Tabela 2	Gráficos de Superfícies de Resposta mostrando - com 360 h- os efeitos das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre: (a) Tensão Superficial, (b) pH, (c) Salinidade e (d) Concentração Mássica Total .....	68
Tabela 3	Resultados de Análises de Variâncias para o planejamento Composto Central.....	67
Tabela 4	Valores críticos (máximo ou mínimo) das variáveis respostas previstas pelos modelos polinomiais quadráticos e as correspondentes concentrações ótimas de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

FISPQ	Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
PNC	Plano Nacional de Contingência
CMC	Concentração Micelar Crítica
ppt	<i>part per thousand</i> (parte por mil)

## Resumo

Atividades de refinarias e acidentes com vazamentos de petróleo e derivados liberam no ambiente hidrocarbonetos altamente tóxicos que representam um grande perigo, especialmente, para as comunidades próximas ao local contaminado. Planejamento Composto Central - associado à Metodologia de Superfície de Resposta – foi realizado para otimizar a biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina. A água do mar foi coletada em praia próxima ao Porto de Suape, Pernambuco, Brasil. Querosene iluminante foi usado como única fonte de carbono, nos ensaios de biodegradação, realizados durante 15 dias, à temperatura de 28°C, em frascos agitados a 200 rpm. Concentração mássica, tensão superficial, pH e salinidade foram usados como indicadores indiretos de biodegradação. A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 mostrou ser capaz de crescer em água do mar usando querosene como única fonte de carbono em condições extremas de estresse salino e alcalino. Modelos preditivos para as variáveis respostas tensão superficial, pH e salinidade em função das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio foram obtidos por análise de regressão. Análise de variância foi usada para avaliar as significâncias e precisões dos modelos. Coeficientes de determinação iguais a 91, 98 e 80% foram obtidos para os modelos da tensão superficial, pH e salinidade, respectivamente. As probabilidades dos resultados serem aleatórios (valores  $p$ ) foram inferiores a 0,05 para tensão superficial e para o pH e a 0,10 para a salinidade. Os desvios relativos entre os resultados experimentais e as previsões dos modelos foram inferiores a 2,2% para tensão superficial e salinidade e inferior a 6% para o pH. Os resultados obtidos indicam que a levedura *C.lipolytica* UCP 0988 é halo-alcáli-tolerante e que ela e seus bioprodutos (biossurfactantes /bioemulsificantes) podem ser úteis para pesquisas teóricas e experimentais sobre mecanismos de múltipla tolerância e biorremediação de petróleo e derivados, como o querosene, em água do mar.

**Palavras-Chave:** Metodologia de Superfície de Resposta, Biodegradação, Querosene, *Candida lipolytica*, Biossurfactante.

## ABSTRACT

Activities of oil refineries and accidental spills with oil and derivatives release in the environment highly toxic hydrocarbons, that represent a great danger, especially for communities near of the contaminated site. Central Composite Design - associated with the Response Surface Methodology- was carried out to optimize the degradation of kerosene by *Candida lipolytica* UCP 0988 in hypersaline and highly alkaline seawater. The seawater was collected in beach near the Porto de Suape, Pernambuco, Brazil. Illuminating kerosene was used as sole carbon source in biodegradation assays, conducted for 15 days, at 28°C, in shake flasks at 200 rpm. Mass concentration, surface tension, pH and salinity were used as indirect indicators of biodegradation of kerosene. The yeast *C. lipolytica* UCP 0988 showed ability to grow in sea water using kerosene as the sole carbon source under extreme alkaline and saline stress. Predictive models for response variables surface tension, pH and salinity as a function of the ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations were obtained by regression analysis. Analysis of variance was used to evaluate the significance and precision of the models. Determination coefficients respectively equal to 91, 98 and 80% were obtained for the models of surface tension, pH and salinity. The  $p$  values were less than 0.05 for surface tension and pH and less than 0.10 for salinity. The relative deviations between the experimental results and the model predictions were less than 2.2% for surface tension and salinity and less than 6% for pH. The results indicate that the haloalkalitolerant yeast *C.lipolytica* UCP 0988 and its bioproducts (biosurfactants /bioemulsifiers) may be useful for theoretical and experimental researches on multiple tolerance mechanisms and bioremediation of oil and oil products, such as kerosene, in seawater

**Keywords:** Response Surface Methodology, Biodegradation, Kerosene, *Candida lipolytica*, biosurfactant

# **CAPÍTULO 1**

## 1.1 Introdução

As atividades petrolíferas são responsáveis por grande parte da economia mundial e trazem desenvolvimento local. Em contraste com esse desenvolvimento, vazamentos e derramamentos acidentais ocorrem regularmente durante a exploração, produção, refino, transporte e armazenamento de petróleo e derivados (DAS; CHANDRAN, 2011).

O meio ambiente marinho atingido por um acidente de derramamento de petróleo pode levar de alguns dias a décadas para se recuperar (LIMA, 2003). Os processos de biodegradação do petróleo e seus derivados são baseados na capacidade de populações microbianas em modificar ou decompor determinados poluentes, através de processos metabólicos (MENEGETTI, 2007).

Muitos micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos (bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas) têm sido identificados e descritos na literatura (BINAZADEH et al., 2009). A levedura ascomiceta *Yarrowia lipolytica* (originalmente classificada como *Candida lipolytica*) é uma das espécies não convencionais mais estudadas (BARTH; GAILLARDIN, 1997) e tem sido usada com sucesso em diversas aplicações biotecnológicas, inclusive em biodegradação de hidrocarbonetos em água do mar.

Na literatura não existem muitos trabalhos sobre biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por leveduras, em condições extremas de pH e salinidade. Na última década, pesquisas sobre produção de biossurfactantes e bioemulsificantes e biodegradação de óleo diesel e querosene em água do mar, em condições ambientais normais e extremamente adversas vem sendo desenvolvidos no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco (VANCE-HARROP et al., 2002; VANCE-HARROP, 2003; ALBUQUERQUE, 2006, ALBUQUERQUE, et al. 2006, ALBUQUERQUE, et al. 2008; SOUZA, 2009; SILVA, 2011; HENRIQUES, 2012; SOUZA, et al., 2012).

Os referidos trabalhos tem ratificado a capacidade de adaptação da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 em condições extremas de toxicidade, pH e salinidade. A levedura *C.lipolytica* UCP 0988 tem mostrado potencial para degradar óleos vegetais, óleo diesel e querosene em água do mar natural ou hipersalina em condições extremas de pH (alcalinidade ou acidez extrema). Estas características revelam o comportamento halo-alcáli-tolerante desta levedura não convencional, tornando-a, junto com seus bioprodutos, importantes para pesquisas teóricas e aplicadas sobre mecanismos de múltipla tolerância de extremófilos e para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação de áreas impactadas com derramamentos de petróleo e derivados.

Em programas de pesquisa com biorremediação *ex-situ*, é possível monitorar e aumentar significativamente a degradação microbiana de petróleo bruto e seus produtos refinados otimizando condições tais como pH, temperatura, nutrientes, presença de metais e substâncias tóxicas, taxas de transferência de oxigênio e número e estado fisiológico de micro-organismos degradadores de óleo, entre outros (KUMAR et al., 2011).

O uso de Metodologia de Superfície de Resposta - MSR (FISHER, 1935, MONTEGOMERY, 2008) para otimização de processos é uma abordagem que vem sendo usada com sucesso, em diversas áreas, por permitir: planejamento e redução do número de experimentos (reduzindo conseqüentemente tempo, custos e problemas). desenvolvimento de modelos e avaliação de efeitos de variáveis independentes ou fatores e pesquisa de condições ótimas para as variáveis respostas de interesse. Nos últimos anos, a MSR vem sendo crescentemente aplicada em otimização de componentes nutrientes de meios para degradação de petróleo e derivados (HUANG et al., 2008; MOHAJERI et al., 2010, AGARRY et al., 2010; SU et al., 2011, AGARRY et al., 2012). Portanto, no presente trabalho a MSR foi adotada para investigar as concentrações ótimas de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio em processos de biodegradação de querosene e de produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Otimização de biodegradação de querosene e de produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do hipersalina e extremamente alcalina

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver modelos polinomiais de segunda ordem para a tensão superficial, o pH, a salinidade e a concentração mássica total em função das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio - com apoio de planejamento composto central rotacional associado a metodologia de superfície de resposta
- Identificar as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio que otimizam a tensão superficial, o pH e a salinidade nos bioprocessos investigados
- Analisar os perfis cinéticos da tensão superficial, do pH, da salinidade e da concentração mássica total, durante um período de 15 dias



## 1.3 Revisão da literatura

### 1.3.1 Petróleo

O petróleo é originado a partir de matéria orgânica resultante de restos de animais depositados nos sedimentos, que ao longo do tempo passaram por reações químicas, bacteriológicas, pressão das camadas sobrepostas e calor. Os dados geológicos da matéria orgânica das bacias sedimentares e caracterização das rochas formadoras são analisados quanto à presença do petróleo. A partir das análises do local, o ponto é escolhido e é feita a perfuração e a extração (GONZÁLES, 2012; LIMA, 2003).

Este recurso não-renovável é a principal fonte energética mundial e é, também, insumo básico para a produção de diversos produtos derivados do petróleo. Alguns estudos apontam um aumento de 24% na produção e no consumo de petróleo, assim como um aumento de 25% na demanda de combustíveis líquidos, entre 2010 e 2035, sugerindo a continuidade da dependência deste recurso nos próximos anos (COSTA, 2012).

Após extração, para que o petróleo tenha seu potencial energético inteiramente aproveitado é necessário que seja desmembrado nos denominados cortes ou frações através de coluna de destilação. Neste processo, o petróleo cru é transformado obtendo-se desta forma a maior quantidade possível de produtos com alto valor agregado com redução daqueles de menor valor comercial (BUENO, 2003). Posteriormente, o óleo cru é convertido em produtos mais refinados, como o gás liquefeito de petróleo, gasolina, querosene iluminante, querosene de aviação, óleo diesel, óleos combustíveis, óleos lubrificantes e matérias-primas para a indústria petroquímica (HAMZA, 2012).

Sua composição é descrita em termos de proporção de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e não-hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos saturados são

constituídos por carbono (C) e hidrogênio (H) unidos por ligação simples e são classificados como alcanos (parafinas normais ou n-alcanos), isoalcanos (isoparafinas ou alcanos ramificados) e os cicloalcanos (alcanos cíclicos ou naftenos). Os hidrocarbonetos aromáticos são constituídos por anel benzênico. O composto aromático mais frequente é o tolueno, seguido do xileno e do benzeno. Naftalenos e fenantrenos também podem estar presentes na mistura (D'EL-REY, 2012).

### **1.3.2 Querosene**

Dentre os destilados médios do petróleo se destacam: querosene iluminante, querosene de aviação, óleo diesel e óleo combustível, os quais contêm parafinas, cicloparafinas, aromáticos e oleofinas com cadeias de aproximadamente 9 a 20 de átomos de carbono. As parafinas de cadeia normal, com número de átomos de carbono variando entre 11 e 12, são os constituintes em maior proporção no querosene (GOMES, 2004).

O querosene, um dos produtos derivados do petróleo, é um líquido, incolor, inflamável, formado por uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, naftênicos e aromáticos, com faixa de destilação compreendida entre 190 e 290°C e com cadeias com número de átomos de carbono variando predominantemente entre 9 e 16 (AKPOVETA; EGHAREVBA; MEDJOR, 2011; Von MÜHLEN et al., 2006).

Os principais componentes presentes no querosene são alcanos e cicloalcanos (68,6%); benzeno e benzeno substituído (13,7%) e naftaleno e naftaleno substituído (KALME et al., 2008). De acordo com suas propriedades, o querosene está classificado como Tipo II, juntamente com produtos semelhantes ao diesel e a produtos brutos leves, por possuírem as seguintes características: moderadamente volátil; evaporação das frações leves, peso específico de 0,80 - 0,85; toxicidade aguda moderada a elevada para a biota; toxicidade específica do produto diretamente relacionada com o tipo e concentração dos compostos

aromáticos na fração solúvel na água (KOLESNIKOVAS; OLIVEIRA; DUARTE, 2009).

Em decorrência de suas características pode apresentar muitos efeitos tóxicos sobre plantas, animais e seres humanos (SONG; BARTHA, 1990). Segundo a Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ, 2011) da Petrobras os principais componentes do querosene iluminante não devem ultrapassar os limites de concentração estabelecidos na Tabela 1.

Tabela 1- Composição Química do Querosene Iluminante

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%)</b>
Benzeno	Max. 0,10 (%vol.)
Hidrocarbonetos parafínicos	Min. 70%
Hidrocarbonetos aromáticos	Max. 20%
Hidrocarbonetos olefínicos	Max. 5%

Fonte: FISPQ, 2011 (modificado).

### **1.3.3 Poluição por hidrocarbonetos do petróleo em ambiente marinho**

No Brasil, a perspectiva de exploração de petróleo é de cerca de 50 bilhões de barris de óleo na área do pré-sal. Com isso há uma tendência de aumento dos acidentes envolvendo derramamento de óleo. Estes eventos provocam grandes

perdas nos serviços prestados pelos ecossistemas, desvalorizando os recursos naturais e causando danos ao meio ambiente marinho e costeiro (COSTA, 2012).

Dentre as principais fontes de contaminação com petróleo no mar destacam-se: exsudação natural, extração, transporte e consumo de petróleo (NAS, 2003). A exsudação natural é a principal fonte de petróleo para o mar (46%), seguida das atividades relacionadas ao consumo (37%), ao transporte (12%) e à extração (3%). A contribuição proveniente de incidentes de plataformas (860 t/ano) é de apenas 0,07% do total global (PEDROSA, 2012).

O meio ambiente marinho atingido por um acidente de derramamento de petróleo pode levar de alguns dias a décadas para se recuperar (LIMA, 2003). A intensa manipulação e o transporte de substâncias químicas em regiões portuárias, indústrias, terminais de armazenamentos, dutos, postos de combustíveis e ao longo das rodovias e ferrovias constituem atividades de risco e podem gerar diversos acidentes ambientais (POFFO, 2005).

Além dos acidentes, as atividades rotineiras geram uma grande quantidade de efluentes industriais contendo hidrocarbonetos de petróleo altamente tóxicos e representam um grande perigo, especialmente para as comunidades próximas a refinarias (HAMZA, 2012). O efluente líquido de refinarias de petróleo contém: óleos separados, emulsificados ou dissolvidos; produtos químicos, inclusive ácidos, álcalis, sulfetos, amônia e fenóis; e também sólidos em suspensão. A toxicidade dos sais presentes nos efluentes de refinarias para os organismos aquáticos pode variar de baixa, como no caso dos cloretos, até alta, no caso dos cianetos (POMBO, 2011).

Os hidrocarbonetos aromáticos, usualmente presentes em menor quantidade, são encontrados em todos os tipos de petróleo, apresentam uma maior toxicidade e uma biodegradação lenta e estão associados a efeitos crônicos e carcinogênicos. São classificados em: hidrocarbonetos monoaromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno, e os isômeros do xileno (comumente denominados de BTEX); os policíclicos, com dois ou mais anéis aromáticos, denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Naftalenos aromáticos apresentam

estruturas cíclicas saturadas e aromáticas ao mesmo tempo (KOLESNIKOVAS; OLIVEIRA; DUARTE, 2009).

Frações de hidrocarbonetos alifáticos, de pequenas e longas cadeias, resultantes da quebra de petróleo bruto incorporado a água do mar artificial, podem ser facilmente biodegradadas por micro-organismos, e é uma das alternativas usadas na biorremediação da poluição do óleo em ambientes marinhos (HYDAYAT; TACHIBANA, 2012). Hidrocarbonetos presentes no efluente apresentam características parafínicas, o que confere biodegradabilidade e, portanto menor impacto ao meio ambiente, exceto o fitano e o pristano que são mais resistentes à degradação (RAMALHO, 2008).

Para evitar ou minimizar os impactos causados por possíveis vazamentos, é necessário a implantação de medidas de prevenção e controle, através principalmente da adoção de convenções ou pela criação de planos de contingência. O planejamento é fundamental para que as operações que visam controlar uma emergência obtenham êxito. Na sua elaboração é possível definir os métodos de atuação, reduzindo o número de decisões a serem tomadas em um ambiente tenso de gerenciamento de crises (PEDROSA, 2012).

No Brasil são legalmente previstos três tipos de planos para o combate as poluições causadas por lançamento de óleo em águas brasileiras, que se complementam quanto ao tipo de acidente ocorrido. O Plano de Emergência Individual (PEI) que é obrigatório para cada instalação e é exigido e aprovado no âmbito Licenciamento Ambiental do empreendimento, o Plano de Área (PA) constituído por diversos planos de emergência individuais, aprovado pelo órgão de licenciamento ambiental, e o Plano Nacional de Contingência (PNC) adotado em acidentes de maiores proporções, nos quais a ação individualizada dos agentes não se mostram suficientes para a solução do problema.

O PNC para incidentes de poluição por óleo em águas, decreto Nº 8.127, de 22 de outubro de 2013, fixa as responsabilidades, estabelece estrutura organizacional e define diretrizes, procedimentos e ações, com o objetivo de permitir as atuações coordenadas de órgãos da administração pública e entidades

públicas e privadas para ampliar a capacidade de resposta em incidentes de poluição por óleo que possam afetar as águas sob jurisdição nacional, e minimizar danos ambientais e evitar prejuízos para a saúde pública (BRASIL, 2013).

#### **1.3.4 Remoção de hidrocarbonetos do petróleo em ambiente marinho**

Para redução dos danos causados por derramamento de óleos, diversos métodos de remediação utilizados internacionalmente podem ser aplicados. Para isso várias técnicas são avaliadas e a opção pelo método a ser aplicado vincula-se fortemente ao tipo de ecossistema atingido (CANTAGALLO; MILANELLI; DIAS-BRITO, 2007).

Entre as opções de técnicas de limpeza utilizadas frequentemente em zonas costeiras, destacam-se: limpeza natural, remoção manual, uso de materiais absorventes, bombeamento a vácuo, “skimmers” (equipamento desenvolvido para remover o óleo da superfície da água, utilizando discos giratórios e cordas absorventes) jateamento com água a diferentes pressões, jateamento com areia, corte de vegetação, queima *in situ*, trincheiras, remoção de sedimentos, biorremediação e produtos dispersantes (CANTAGALLO; MILANELLI; DIAS-BRITO, 2007).

Muitos processos importantes influenciam o destino de hidrocarbonetos no meio ambiente. Entre estes estão adsorção, volatilização, transformações abióticas (química ou fotoquímica) e a biotransformação (KORDA, et al., 1997). Adsorção e volatilização não destroem os contaminantes, mas, em vez disso, acumulam ou os transportam para outros locais. Transformações químicas abióticas envolvendo contaminantes orgânicos são geralmente lentas, enquanto que as reações fotoquímicas são insuficientes na maioria dos ambientes (SANTOS, et al., 2011).

Pesquisas baseadas na transformação de materiais poliméricos para a absorção de petróleo derramado na água do mar, a partir do desenvolvido de macromoléculas de cardanol-furfural, denominadas de resinas verdes magnéticas, estão sendo estudadas por possuírem a capacidade de remover o petróleo derramado e recuperá-lo em um novo fracionamento através da aplicação desta nova técnica de limpeza (VARELA et al., 2013).

As técnicas convencionais de limpeza usada em áreas contaminadas com petróleo e seus derivados podem ser complementadas com a remediação, pelo uso de dispersantes químicos ou de biossurfactantes. A biorremediação diminui o impacto de substâncias recalcitrantes no ambiente e o dispersante químico pode promover a degradação mais rápida do óleo. Sua aplicação deve ser sempre avaliada por profissionais especializados em meio ambiente, já que ela pode ser vista como uma introdução deliberada de um contaminante (BENTO, 2005) e deve seguir normas de procedimentos, segundo Instrução Normativa nº 5, de 17 de maio de 2010, junto ao IBAMA (IBAMA, 2010).

O tratamento de ambientes contaminados com produtos leves de petróleo, como gasolina, é realizada de forma eficaz por processos físico-químicos naturais. Entretanto, combustíveis mais pesados como diesel e o querosene, levam meses para completa remediação natural devido as suas baixas volatilidades (PAVITRAN et al., 2006). Por esta razão, pesquisas tem sido realizadas na busca da biodegradabilidade de alguns produtos petrolíferos comerciais (SUGIURA et al., 1997), tais como querosene (NOCENTINI et al., 1997; GOUDA et al., 2007).

Métodos de biorremediação ambiental são métodos relativamente baratos e menos invasivos em relação aos processos físico-químicos de remediação. Estes métodos têm focado, por exemplo, o uso conjunto de biossurfactantes e enzimas produzidas a partir de recursos renováveis, como subprodutos agrícolas e ou resíduos agro-industrial. (AMODU; OJUMU; NTWAMPE, 2013).

### 1.3.5 Biorremediação

A biorremediação é definida como um processo que utiliza micro-organismos, plantas ou enzimas para transformar contaminantes em compostos menos tóxicos. O componente mais importante na biorremediação é a utilização de micro-organismos, que produzem compostos envolvidos nas reações de degradação e levam à eliminação ou desintoxicação do poluente químico. A biorremediação vem sendo cada vez mais aplicada, devido aos seus custos e benefícios e a sua finalidade de mineralizar o poluente (OKOH; TREJO-HERNANDEZ, 2006; CERQUEIRA et al., 2012).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas - segundo o local de aplicação - em técnicas *in situ* ou *ex situ* (JACQUES et al., 2005). A biorremediação *in situ* permite a descontaminação no próprio local, evitando os custos de remoção e posterior tratamento e a *ex situ* requer a remoção do poluente para tratamento em outro local permitindo o monitoramento efetivo do processo e maior controle das variáveis (pH, temperatura, umidade, etc.) (MENEGETTI, 2007).

Técnicas de biorremediação geralmente envolvem: (1) a adição de nutrientes ou bioestimulação, que aumenta a atividade microbiana nativa, (2) adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras ou bioaugmentação e (3) adição de surfactantes, que auxiliam a metabolização dos compostos poluentes, facilitando o transporte destes substratos orgânicos para o interior das células microbianas ou diminuindo as interações superficiais do contaminante, ou ainda (4) a adição de enzimas comerciais, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em moléculas de fácil assimilação pelos micro-organismos (MENEGETTI, 2007).

No Brasil, a remediação de ecossistemas contaminados por substâncias potencialmente poluidoras, incluindo petróleo e seus derivados, decorrente de acidentes de vazamentos é considerada uma opção viável, nas ações específicas



de recuperação destes locais, como também no tratamento de resíduos e efluentes, na desobstrução de dutos e equipamentos, sendo regulamentada pelo CONAMA 314 de 29 de outubro de 2002 (CONAMA, 2002).

Nesta resolução fica determinado que “... os remediadores devem ser registrados junto ao IBAMA, para fins de produção, importação, comercialização e utilização, bem como, obter anuência prévia para a pesquisa e experimentação” (CONAMA, 2002). A Instrução Normativa IBAMA nº 5, estabelece os procedimentos e exigências a serem adotados para efeito de registro, renovação de registro e anuência prévia para a realização de pesquisa e experimentação com produtos remediadores (IBAMA, 2010).

Produtos para biorremediação registrados pelo IBAMA vêm sendo comercializados para aplicação em estações de tratamento, industriais (têxteis, químicas, farmacêuticas, petroquímicas) e efluentes em geral para remoção de cargas de lipídios, proteínas, celulose e amidos, entre outras. A aplicação varia de acordo com a especificidade de cada produto. As empresas registradas estão concentradas nos Estados de Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Minas Gerais (IBAMA, 2013).

### **1.3.6 Surfactantes**

Os surfactantes constituem uma classe de moléculas extremamente importantes na indústria. A demanda mundial por surfactantes ultrapassou 7,5 milhões de toneladas em 2010 e está projetada para gerar mais de US \$ 41 bilhões em receita em 2018. São utilizados como detergentes, na indústria têxtil, produtos de higiene pessoal, produtos farmacêuticos, agricultura, tintas, plásticos, e muitas outras classes de produtos (SOEMO, 2013).

Também denominados tensoativos ou agentes de superfície ativa, os surfactantes são moléculas ativas em interfaces e possuem característica polar

(hidrofílica) e apolar (hidrofóbica) em sua constituição (SEKHON, 2013). Os grupos hidrofóbicos, que constituem a parte apolar da molécula (denominado cauda), são insolúveis em água e podem ter uma cadeia longa de ácidos graxos, e hidroxilo  $\alpha$ -alquil-hidroxi- $\beta$  ácidos. Os grupos hidrofílicos que constituem a parte polar da molécula (denominada cabeça), podem ser constituídos por carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácidos carboxílico ou álcool (CHIOMA et al., 2013).

De acordo com a carga elétrica do composto químico presente em sua extremidade polar, os surfactantes podem ser classificados em quatro grupos, ilustrados na Figura 1: catiônicos, aniônicos, anfotéricos e não-iônicos.

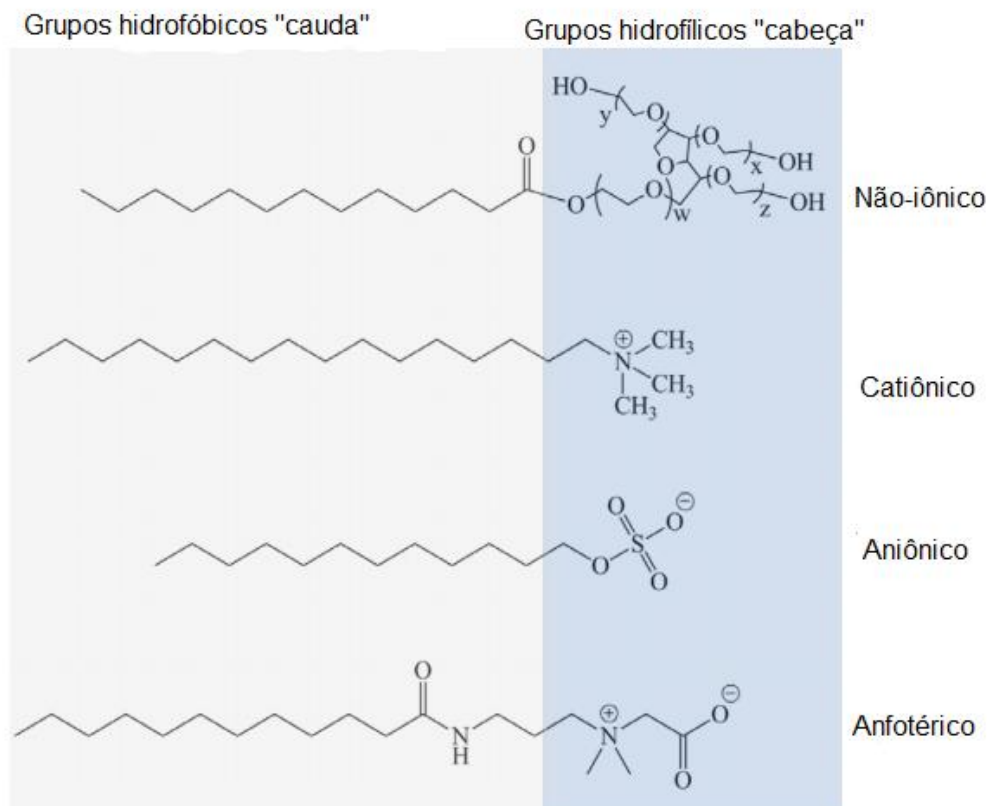


Figura 1 - Classificação geral dos surfactantes baseada na carga presente nas extremidades dos surfactantes. Não-iônico (ex: Polioxietileno sorbitano), catiônico (cetiltrimetil amoniam brometo, CTAB), aniônico (dodecil sulfato de sódio, SDS) e anfotérico (Cocoamidopropil betaína). Fonte: Soemo, 2013 (modificado).

Na extremidade polar, os tensoativos catiônicos têm uma carga positiva, os aniônicos têm uma carga negativa e os anfotéricos têm o potencial de possuir cargas positivas ou negativas, dependendo do ambiente em que são colocados. Surfactantes não-iônicos não têm carga na extremidade polar (SEKHON, 2013).

Esta natureza anfílica faz com que as moléculas surfactantes se posicionem entre a interface de duas camadas imiscíveis, orientando a cauda para o meio não-polar, e a cabeça hidrofílica para o solvente polar (SOEMO, 2013). Esta afinidade faz com que ocorra a redução da energia livre do sistema, pela substituição das moléculas de mais alta energia situada nas interfaces, alterando as propriedades de fases superficiais, entre um líquido e um gás, e interfaciais, entre dois líquidos imiscíveis. A distribuição nas interfaces ocorre entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (água/óleo, óleo/água) (MULLIGAN, 2005; BARBOSA, 2011).

Entre as características funcionais prioritárias para a aplicação dos surfactantes na indústria merecem destaque (SOEMO, 2013):

- Redução da tensão da superfície entre duas fases;
- Capacidade para formar estruturas agregadas em solução quando a superfície estiver saturada. O exemplo clássico de um agregado de surfactante é uma micela.

A tensão superficial é a propriedade que um líquido possui em manter as moléculas unidas em sua superfície (forças intermoleculares). Definida como a força que atua sobre a superfície por unidade de comprimento de área perpendicular a força (BARBOSA, 2011). Quanto maior a tensão superficial inicial mais eficaz é o surfactante na redução da tensão superficial na interface (SOEMO, 2013).

Na Figura 2 é apresentado um gráfico da tensão superficial em função da concentração do surfactante, no qual quatro regiões distintas para a tensão superficial podem ser observadas. Na região 1, antes da adição do surfactante, a tensão superficial é da água pura, 72 mN/m. Na região 2, a medida que a

concentração do surfactante aumenta, os monômeros na solução migram para a superfície, e a tensão superficial diminui. Um equilíbrio é estabelecido entre os monômeros na solução e aqueles localizados na superfície. Em determinada concentração do surfactante, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC) - marcada por uma inflexão no gráfico da tensão superficial (Ponto 3) - todos os locais da superfície ficam ocupados pelos monômeros e a tensão superficial atinge seu valor mínimo ( $\gamma_{CMC}$ ). Depois deste ponto, na região 4, qualquer surfactante adicionado, ficará abaixo da superfície, saturando a solução e forçando a formação de agregados moleculares de dimensões coloidais, denominados micelas. Na região 4 não há alteração da tensão superficial, pois o número de moléculas sobre a superfície é constante, já que atingiu seu valor máximo. Dependendo das condições da solução, as micelas podem tomar várias formas, resultantes da força dirigida das moléculas de surfactantes individuais para minimizar a interação de suas caudas hidrofóbicas com o meio aquoso (SOEMO, 2003).

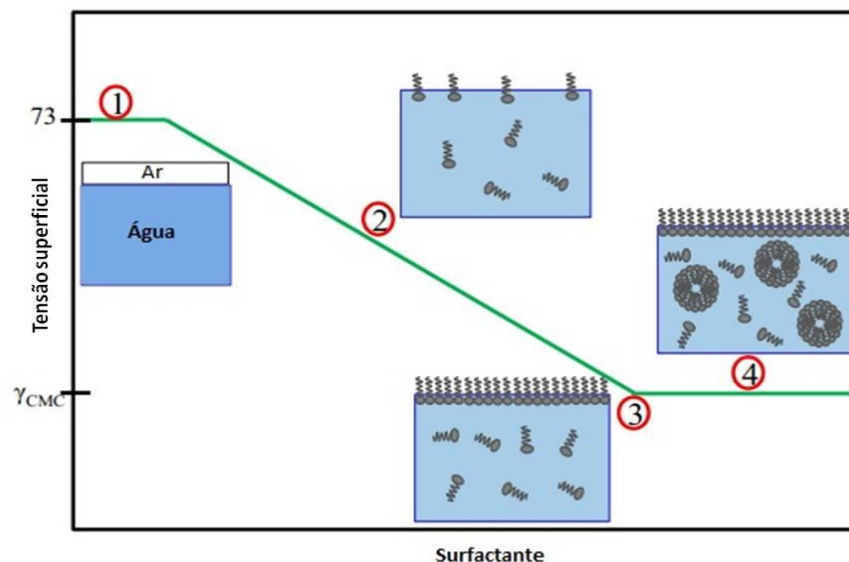


Figura 2 - Resposta da tensão superficial na interface ar-água com o aumento da concentração de surfactante. Fonte: Soemo, 2013 (modificado).

No derramamento de óleo da plataforma *Deepwater Horizon*, em abril de 2010, no Golfo do México foi utilizado uma mistura de agentes tensoativos, denominado COREXIT, para dispersar e evitar o acúmulo de óleo na superfície. O surfactante auxiliou na emulsificação do óleo em gotículas pequenas, com maior disponibilidade para degradação por micro-organismos. A preocupação, no entanto, é que surfactantes sintéticos podem ter impacto ambiental em longo prazo, fazendo com que as Agências de Proteção Ambiental, explorem outros dispersantes alternativos como biossurfactantes (SOEMO, 2013).

### 1.3.7 Biossurfactantes

Os surfactantes sintéticos são produzidos por reações químicas a partir de compostos petroquímicos. Os biossurfactantes são produzidos por ação biológica no meio extracelular por micro-organismos tais como, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Comparado com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem várias vantagens, incluindo: alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica, biocompatibilidade (que permite sua utilização em cosméticos, produtos farmacêuticos e aditivos de alimentos funcionais) e capacidade de ser produzido a partir de substratos renováveis (BANAT, 1995; CHIOMA et al., 2013; KAPADIA; YAGNIK, 2013). Entretanto, o custo final de um biossurfactantes, muitas vezes, inviabiliza sua produção. Esforços para aplicação de recursos renováveis vêm sendo feitos, como uma estratégia econômica. A escolha de um substrato de baixo custo é importante para a economia global do processo, porque eles são responsáveis por 30% ou mais do custo total do produto (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RUFINO et al., 2014) .

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana. As bactérias produtoras mais reportadas pertencem aos gêneros: *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* e *Arthrobacter sp.* (FONTES, et al., 2008). As leveduras também são conhecidas por produzir

biossurfactantes em concentrações elevadas, o que é uma vantagem em relação a esses micro-organismos (ACCORSINI, 2012). Diversas espécies de *Candida* têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes. A tabela 2 apresenta as espécies de leveduras mais estudadas e os respectivos biossurfactantes produzidos.

Tabela 2 Principais espécies de leveduras produtoras de biossurfactantes

<i>Tipo de biossurfactante</i>	<i>Micro-organismo produtor</i>	<i>Referência</i>
Manoproteína	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ;	Lukondeh; Ashbolt; Rogers, 2003
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cameron; Cooper; Neufeld, 1988
Soforolipídeos	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Jing, C. et al., 2006
	<i>Candida bombicola</i>	Casas, J.; Ochoa, F. G., 1999
	<i>Torulopsis petrophilum</i>	Cooper, D.G.; Paddock, D. A., 1984
	<i>Candida bogorienses</i>	Tulloch, A.P.; Spencer, J.F. T., 1968
Manosileritritol- Lipídeos	<i>Candida antarctica</i>	Kitamoto, D. et al., 1999
	<i>Candida sp.</i> SY16	Kim, H. S. et al., 2006
	<i>Kurtzmanomyces sp.</i> I-11	Kakugawa, K. et al., 2002
	<i>Pseudozyma fusiformata</i> ,	Morita, T. et al., 2006
	<i>P. parantarctica</i> ,	
	<i>P. tsukubabaensis</i>	
	<i>P. rugulosa</i>	Morita, T. et al., 2006
<i>P. aphidis</i>	Rau, U. et al., 2005	
Complexo carboidrato – proteína- lipídeo	<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Amaral, P. F. F. et al, 2006
	<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589	Zinjarde, S. S.; Pant, A., 2002
	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	
	<i>Candida tropicalis</i>	Singh, M.; Desai, J. D., 1989
	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	Vance-Harrop, M. H. V. et al. 2003
Complexo carboidrato - proteína Ácido graxo	<i>Candida lipolytica</i> ATCC 8662	Cirigliano, M.; Carman, G.M., 1984
	<i>Candida ingens</i>	
	<i>Candida utilis</i>	
	<i>Candida valida</i>	Amézcuca-Veja et al., 2007
	<i>Candida boleticola</i>	Sheperd, R. et al., 1995
Polióis – lipídeos	<i>Rhodotorula glutinis</i> ,	Moussa, T. A. A., 2006
	<i>Rhodotorula graminis</i>	Yoon, S. H.; Rhee, J. S., 1983

Fonte: Fontes, 2008.

Tecnologias baseadas em aplicações de iossurfactantes e micro-organismos produtores de biossurfactantes vem sendo usadas com sucesso na recuperação de ambientes contaminados com compostos orgânicos e inorgânicos, tais como hidrocarbonetos e metais. A diversidade de biossurfactantes torna estes compostos em um grupo potencialmente atrativo para uma grande variedade de aplicações industriais e biotecnológicas (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

### **1.3.8 Biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo**

A biodegradação é a forma pela qual a natureza recicla os resíduos, quebrando os compostos orgânicos em moléculas menores e disponibilizando os nutrientes. É definida como a capacidade biológica de transformar compostos quimicamente, reduzindo sua complexidade (JOUTEY et al., 2013). A matéria biodegradável, em geral, é formada de material orgânico: vegetal, animal e outras substâncias de origem orgânica ou material artificial compatível que possa ser utilizado por micro-organismos (JOUTEY et al., 2013).

Os micro-organismos estão por toda parte e colonizam diversos ambientes a milhares de anos. Eles são os principais componentes das cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos e atuam na manutenção e sobrevivência de plantas, animais e outros organismos através de relações simbióticas. São os únicos agentes biológicos capazes de regenerar os elementos necessários para outros organismos (PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011).

Alguns micro-organismos degradadores possuem capacidade de desintoxicar ou remover poluentes, devido às suas diversas capacidades metabólicas. Bactérias, fungos filamentosos e leveduras são utilizados para remoção e degradação de diversos poluentes ambientais, incluindo os produtos da indústria petrolífera (DAS; CHANDRAN, 2011). Eles são capazes de degradar

catabólitos e transformar ou acumular uma enorme gama de compostos, incluindo hidrocarbonetos, como, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), radionuclídeos e metais (LEITÃO, 2009). O uso de petroderivados como fonte de carbono para o crescimento fúngico tem sido realizado de forma eficaz utilizando micro-organismos em processos industriais e ainda na biorremediação de ambientes contaminados (MARCIEL et al., 2013).

Os mecanismos para degradação de hidrocarbonetos de petróleo têm sido extensivamente estudado e um número de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras têm sido isolados e caracterizados por sua habilidade para degradar hidrocarbonetos de petróleos (HARAYAMA et al., 2004; HARWATI et al., 2007). A tabela 3 lista algumas espécies de micro-organismos degradadores de petróleo.

Tabela 3 - Micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo

<i>Composto</i>	<i>Micro-organismo</i>	<i>Referências</i>
Alcano	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Micrococcus sp.</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Ochrobactrum sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Serratia marcescens</i> e <i>Candida tropicalis</i> <i>Alcaligenes odorans</i> <i>Brevibacillus sp.</i>	Herman et al. (1997); Churchill et al.; Grishchenkov et al (2000); Cybulski et al. (2003); Rosenberg et al. (2002); Lal & Khanna (2006); Das et al.(1998); Hua et al.(2003); Park et al.; Burry & Miller; Sugaira et al.; Ijah (1998); Lal & Khanna (1996); Grishchenkov et al.;
Monoaromático	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Alcaligenes odorans</i> <i>Sphingomonas paucimobolis</i>	Churchill et al.; Lal & Khanna (1996); Willumsen & Arvin (1999);
Poliaromáticos	<i>Achromobacter sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>  <i>Mycobacterium flavescens</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	Sunggyu (2003);  Doong & Lei (2003); Volkering et al. (1993); Straube et Al. (1999); Kwok & Loh (2003); Churchill et al.; Ross et al. (1998).

Fonte: SINGH, 2013.



Os processos de biodegradação do petróleo são baseados na capacidade de populações microbianas em modificar ou decompor determinados poluentes, através de processos metabólicos e enzimáticos, utilizando os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono (C) e energia para o seu crescimento. A degradação completa destes hidrocarbonetos resulta em produtos finais menos tóxicos como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e biomassa celular (MENEGETTI, 2007).

Biodegradação de hidrocarbonetos, tanto em compostos alifáticos quanto em aromáticos, pode ocorrer em condições anaeróbias ou aeróbias (HAMM; SINGH; WARD, 2003). A degradação anaeróbia é catalisada por bactérias anaeróbias, tais como as bactérias redutoras de sulfato, utilizando diferentes aceptores de elétrons terminais (PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011). A condição de degradação aeróbia ocorre pela incorporação de oxigênio intracelular através de reações enzimáticas catalisadas por oxigenases e peroxidases (DAS; CHANDRAN, 2011).

Consórcios microbianos com alta capacidade enzimática são mais eficazes em biodegradar hidrocarbonetos no solo que em ambientes aquáticos (BARNABAS, 2013). Uma das formas de se utilizar a capacidade degradativa das enzimas é aplicá-la diretamente no local contaminado. A utilização de enzimas livres evita o uso de organismos exógenos ou geneticamente modificados no ambiente (PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011).

O potencial genético e fatores ambientais tais como temperatura, pH e fontes disponíveis de nitrogênio e fósforo (FRITSCHER; HOFRICHTER, 2000), e salinidade (CHANDANKERE et al., 2014) – exercem forte influência sobre a taxa e a extensão da biodegradação.

Estudos de aplicações de engenharia genética de micro-organismos em biorremediação têm recebido muita atenção. Estes micro-organismos geneticamente modificados têm capacidade degradativa superior e demonstram sucesso na degradação de diversos poluentes em condições definidas. No entanto, preocupações ambientais e restrições regulatórias são os principais

obstáculos para ação de testes com micro-organismos geneticamente modificados em campo (MENN, EASTER e SAYLER, 2008; JOUTEY et al., 2013).

A velocidade e a extensão com que os componentes do petróleo são degradados dependem da existência de, pelo menos, quatro fatores principais (BAIRD et al., 2002; PEDROTI et al., 2007): (i) Umidade, para facilitar as reações; (ii) Oxigênio, para rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo, já que sob condições anaeróbicas, a biodegradação é mais lenta e normalmente efetuada por bactérias sulfato-redutoras; (iii) Contato óleo-agua, devido a relativa insolubilidade do óleo na água, tal contato controla a velocidade de oxidação e da degradação; (iv) Presença de nutrientes (fosfatos, sulfatos, nitratos, etc) para o desenvolvimento microbiano.

### **1.3.9 Leveduras Ascomicetas utilizadas em Biotecnologia**

Os ascomicetos são um grupo de leveduras produtoras de vários produtos biotecnológicos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada em todo o mundo na produção de alimentos fermentados, como cervejas, sidras, vinhos, bebidas destiladas, produtos de panificação, além de outros processos industriais como, na produção de etanol, proteína unicelular, rações e forragens, enzimas industriais, e pequenos metabolitos com baixo peso molecular (JOHNSON, 2012).

Outras leveduras não-convencionais vêm sendo cada vez mais utilizadas na produção de biocatalisadores e em rotas multi-enzimáticas para a síntese química de pequenos compostos com baixo peso molecular, com importância medicinal e nutricional. Também possuem papel na agricultura como agentes de controle biológico, biorremediação e como indicadores de qualidade do meio ambiente (JOHNSON, 2012).

Johnson (2012) cita as principais leveduras ascomicetas utilizadas na biotecnologia: *Candida spp.*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula spp.*, *Ogataea spp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lipomyces spp.*, *Pichia*

*stipitis*, *Schefferomyces stipitis*, *Pichia spp.*, *Komagataella spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycopsis spp.*, *Schwanniomyces occidentalis* e *Yarrowia lipolytica*.

### **1.3.10 *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*)**

*Yarrowia lipolytica* é um microrganismo aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, (BARTH; GAILLARDIN, 1997). A espécie foi originalmente, classificada como *Candida lipolytica*, desde que nenhum estado sexual tinha sido descrito. A forma perfeita foi reclassificada primeiro como *Endomycopsis lipolytica*, depois como *Saccharomycopsis lipolytica* e finalmente como *Yarrowia lipolytica* (BARTH; GAILLARDIN, 1997; BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009; MARTINS et al., 2012).

Esta levedura estritamente aeróbia, dimórfica, não patogênica (GROENEWALD et al., 2013), apresenta uma vasta aplicação biotecnológica por sua capacidade de metabolizar lipídeos e hidrocarbonetos e de excretar diversos metabólitos em grande quantidade como ácidos orgânicos e proteínas extracelulares, sendo muito usada para expressão e secreção de proteínas específicas (BARTH; GAILLARDIN, 1997; NUNES et al., 2011; NUNES et al., 2013).

Tradicionalmente, as leveduras são classificadas de acordo com sua capacidade de utilizar determinadas fontes de carbono e nitrogênio em temperaturas específicas. Na 5ª edição da *The Yeasts: a Taxonomic Study*, uma chave de identificação com base em tais características pode ser utilizada na identificação da *Yarrowia lipolytica*. Em alguns casos, no entanto, não é possível devido a características relacionadas com *Candida deformante*. As análises das sequências das regiões ITS e domínios D1/D2 são confiáveis para a identificação de espécies de *Yarrowia*. Recentemente, a região ITS foi escolhida como o código

de barras de fungos, mas, para as leveduras, o uso de ambas as regiões DNAr é recomendada (GROENEWALD, 2013, apud KURTZMAN et al., 2011).

A levedura *Yarrowia lipolytica* teve seu genoma sequenciado há 10 anos. Entre as características mais importantes desse genoma se destacam: o tamanho, teor das estruturas dos centrômeros dos cromossomos e elevada quantidade de genes. Entre os genes codificados, predominam genes codificadores de enzimas que metabolizam n-alcanos, gorduras e ácidos graxos (RYWINSKA et al., 2013).

Este organismo vem sendo utilizado como modelo em estudos de dimorfismo, tolerância ao sal, expressão de proteínas, acúmulo de lipídeos e aplicação em biorremediação de poluentes como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009). *Y. lipolytica* degrada vários substratos hidrofóbicos eficientemente e é considerada uma levedura oleaginosa pela habilidade de acumular uma larga quantidade de lipídeos, potencial na bioconversão de ácidos graxos, produção de biodiesel, hidrólise e a incorporação de substratos de petróleo (BEOPOULOS et al., 2009). Devido às suas capacidades, têm sido o foco de estudos em biorremediação, sendo utilizado como agente promissor para o tratamento de áreas contaminadas (MARTINS et al., 2012).

O acúmulo de lipídeos requer estratégias de adaptação elaboradas de utilização de substratos hidrofóbicos, tais como o n-alcanos, ácidos graxos e de triacilgliceróis. A adesão das gotas hidrofóbicas se dá por adaptação de genes ao utilizar estes substratos, modificando a superfície celular maximizando assim o contato do substrato celular e por mecanismos de transporte complexos para a incorporação destes compostos dentro da célula. *Yarrowia lipolytica* tem pelo menos 13 famílias de genes envolvidos na utilização de substratos hidrofóbicos (BEOPOULOS et al., 2009).

*Yarrowia lipolytica* vem sendo usada com modelo para estudos por apresentar fases morfológicas (hifa, pseudohifa e levedura) bem definidas e não ser patogênica. Estes estudos utilizam o N-acetilglicosamina e soro fetal bovino na indução de hifas para testes com o farnesol, um inibidor de biofilme. O

conhecimento dos mecanismos que o regulam pode auxiliar na terapia de doenças causadas por fungos dimórficos, através do desenvolvimento de novos fármacos (NUNES, 2011 e NUNES et al., 2013).

*Yarrowia lipolytica* possui uma alta capacidade de gerar produtos de alto valor agregado (grande interesse industrial) como lipases, ácido cítrico e proteínas unicelulares, além de várias enzimas como lipases (KISHAN et al, 2013), proteases, esterases e fosfatases (OLIVEIRA, 2009), além de diferentes agentes emulsificantes, por exemplo, Liposan isolado a partir de culturas cultivadas em hexadecano (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985), Yansan a partir de culturas cultivadas em glicose (FONTES et al., 2010; AMARAL, 2007; AMARAL et al., 2006) e Rufisan de culturas cultivadas em óleo de soja e resíduo de refinaria (RUFINO et al., 2011).

Estudos de produção de bioemulsificantes/biossurfactantes (VANCE-HARROP et al., 2003, ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2006) e de biodegradação de óleo diesel (SOUZA, 2009, SOUZA et al., 2012, HENRIQUES et al, 2011, HENRIQUES, 2013) e querosene (SILVA et al, 2011, SILVA, 2012), em água do mar tem ratificado a extrema tolerância desta levedura a diversas situações de estresse múltiplo, envolvendo estresses salino, tóxico e ácido ou alcalino.

### **1.3.11 Otimização de Processos de Biodegradação**

Vários fatores abióticos podem influenciar o crescimento e a quebra de hidrocarbonetos por populações microbianas. Os nutrientes constituem um fator predominante na biodegradação, em especial o nitrogênio e o fósforo. Em grandes derramamentos de óleo ocorridos em ambientes marinhos e de água doce, nos quais a oferta de carbono é significativamente aumentada, a necessidade de nitrogênio e fósforo, em geral torna-se um fator limitante na degradação do petróleo (ATLAS, 1991).

A utilização de planejamentos fatoriais associados a Metodologia de Superfície de Resposta permite determinar experimentalmente, níveis “ótimos” de nutrientes, contribuindo assim para o desenvolvimento de melhores métodos de remediação, para a minimização do número de experimentos e para a aquisição de informações sobre os principais efeitos das variáveis independentes ou fatores e de suas interações sobre as variáveis dependentes ou variáveis resposta do planejamento. Esta técnica estatística vem sendo aplicada com sucesso em muitos campos. A utilização da técnica permite selecionar os melhores materiais, equipamentos, processo e condições para obter as variáveis e intervalos corretos para estudo posteriores (MYER; MONTGOMERY, 2009).

O planejamento de meios de fermentação é uma tarefa que consome tempo, mas permite alcançar desempenho satisfatório em bioprocessos (KENNEDY et al., 1992). Planejamento de meios para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes e para biodegradação de petróleo e derivados permite reduzir tempo e custo e aumentar a produtividade e o desempenho nestes bioprocessos. Metodologia de superfície de resposta associada a planejamento composto central vem sendo aplicada com sucesso na otimização de variáveis de estado e parâmetros operacionais - como concentração de nutriente volume e concentração de inóculo, pH, temperatura, velocidade de agitação, tempo de produção - em processos de produção de bioemulsificante/biossurfactante (ALBUQUERQUE et al., 2006; FONTES et al., 2010; MELO, 2011; LUNA et al., 2011) e de biodegradação de petróleo (MOHAJERI et al., 2010), óleo diesel (HUANG et al., 2008; HENRIQUES, 2013; MALIJI, et al., 2013), querosene (AGARRY et al., 2010; AGARRY et al., 2012;), óleo motor (SU et al., 2011), entre outros (CHANDANKERE, et al., 2014)

Técnicas de Computação Bioinspirada como redes neurais artificiais e algoritmos genéticos também tem apresentado resultados satisfatórios em modelagem e otimização empíricas de processos de produção de biossurfactantes (MELO, 2011) e de biodegradação de óleo diesel (GARCIA, 2009); querosene (CASSIMIRO, Jr., 2012).

Com a validação experimental e a aplicação adequada dos resultados obtidos a partir da modelagem e otimização, os processos de produção de biossurfactantes e de biodegradação de petróleo e derivados podem ser implementados em biorreatores, permitindo dessa forma, controlar as variáveis do processo com máxima eficiência.

### 3.1 Referências Bibliográficas

ACCORSINI, F. R.; MUTTON, M. J. R.; LEMOS, E. G. M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p.116-125, 2012.

AGARRY, S.E., OWABOR, C.N., YUSUF, R.O. Studies on Biodegradation of Kerosene in Soil under Different Bioremediation Strategies. **Bioremediation Journal**, v.14, p.135-141, 2010.

AGARRY, S.E.; OWABOR, C.N.; YUSUF, R. O. Enhanced Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Kerosene: Optimization of Biostimulation Agents through Statistical Experimental Design. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology**, v.3, p.1-8, 2012.

AKPOVETA, O.V.; EGHAREVBA F.; MEDJOR O.W. A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 2, p.54-67, 2011.

ALBUQUERQUE, C.D.C. **Processo de Produção de Bioemulsificante por Candida lipolytica**: Otimização, Ampliação de Escala e Desenvolvimento de Softsensor baseado em Redes Neurais Artificiais. 2006. 340f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas (SP), 2006.

ALBUQUERQUE, C.D.C; FILETI, A.M.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Can.J.Microbiol.**, v.52, n.6, p.575-583, 2006.

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**. 2007. 246 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.



AMARAL, P.F.F.; SILVA, J.M. da; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M. e COUTINHO, J.A.P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.41, p.1894–1898, 2006.

AMODU, O.S.; OJUMU, T. V.; NTWAMPE S. K. O. Bioavailability of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Renewable Resources. **Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications**, cap.8, p.172-194, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/54727>>. Acesso em: 04 fev. 2014.

ATLAS, R. M. Microbial Hydrocarbon Degradation - Biorremediation of Oil Spills. **J. Chem Tech. Biotechnol**, v. 52, p.149-156, 1991.

BAIRD, C. Química Ambiental. Ed. Bookman. Sao Paulo-SP. p. 662, 2002.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v.51, p.1-12, 1995.

BANKAR, A.V.; KUMAR, A.R.; ZINJARDE S.S. Environmental and industrial application of *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.84, p.847-865, 2009.

BARBOSA, S. A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima**. 2011. 151 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)/ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2011. Disponível em: <[http://bdtd.ufs.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=649](http://bdtd.ufs.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=649)>. Acesso em: 04 fev. 2014.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.19, p.219-237, 1997.

BENTO, D. M. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. Dissertação (Mestrado), 2005. 112 f. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v.48, p. 375–387, 2009.

BINAZADEH, M.; KARIMI, I.A.; LI, Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus sp.* Moj-3449. **Enzyme and Microbial Technology** , v.45 , p.195–202, 2009.

BRASIL. Plano Nacional de Contingência para Incidentes de Poluição por Óleo em Águas. Decreto Nº 8.127, de 22 de outubro de 2013. Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Decretos/2013/dec\\_8127\\_2013\\_institui\\_plano\\_nacional\\_contigencia\\_incidentes\\_de\\_polui%C3%A7%C3%A3o\\_%C3%B3leo\\_altr\\_dec\\_4871\\_2003\\_4136\\_2002.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Decretos/2013/dec_8127_2013_institui_plano_nacional_contigencia_incidentes_de_polui%C3%A7%C3%A3o_%C3%B3leo_altr_dec_4871_2003_4136_2002.pdf) > Acesso em: 04 abr. 2014.

BUENO, C. **Planejamento Operacional de Refinarias**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), 2003. 125 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CASSIMIRO JR., R.. **Otimização usando algoritmos genéticos de biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988**. 105f., Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2012.

CANTAGALLO C.; MILANELLI, J C. C.; DIAS-BRITO, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Panamjas/Pan American Journal of Aquatic Sciences**, v.2 p.1-12, 2007.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for

application in bioremediation. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 1203–1222, 2012.

CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, K. A.; CHOI, M. M. F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. **Fuel**, p.1-9, 2014.

CHIOMA, O.; OGECHUKWU, M.; BRIGHT, O.; SIMON, O.; CHINYERE, A. Isolation and characterization of biosurfactants producing bacteria from oil polluted soil. **Journal of Natural Sciences Research**, v.3, n.5, 2013.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, n.4 p. 747-750, 1984.

CONAMA. Resolução nº 314, de 29 de outubro de 2002. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res02/res31402.html>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

COSTA, D.M.B. **A valoração econômica como ferramenta para compensação de derramamentos de petróleo**. 2012. 217 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Planejamento Energético (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

D'EL-REY, D. S. C. **Desenvolvimento de novas metodologias a geoquímica inorgânica de petróleo: aplicação de isótopos de Os E Nd**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília/ Instituto de Geociências, Brasília, 2012.

FISPQ. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. Petrobras. Número FISPQ-BR613, versão: 1, p. 1-8, 2011.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; e COELHO M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, p.2091-2099, 2008.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; NELE, M. e COELHO, M. A. Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

FRITSCHÉ, WOLFGANG; HOFRICHTER, MARTIN. Aerobic degradation by microorganisms. **Biotechnology**, v. 11, p. 146-164, 2000.

GARCIA, F. A. M. **Redes neurais artificiais como ferramenta de apoio ao desenvolvimento de meios de produção de biossurfactante**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimentos de Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.

GOMES, E. B. **Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de Suape-PE**. 2004. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

GONZÁLES, M. B. **Análise das rochas formadoras constancia e cifuentes (Jurássico Superior) através de parâmetros petrográficos e de geoquímica orgânica**. Bacia da margem continental cubana. 2012. 294 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Instituto de Geociências, Porto Alegre, 2012.

GOUDA, M. K.; OMAR, S.H.; CHEKROUD, Z. A.; Eldin, H. M. N. E. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. **Chemosphere**, v. 69, p. 1807-1814, 2007.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; DIJCK, P. W. M. VAN; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-20, 2013.

HAMME, J. D. V.; SINGH, A. e WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.67, n.4, p. 503-549, 2003.

HAMZA, USMAN D.; MOHAMMED, IBRAHIM A.; SALE, ABDULLAHI. Potentials of bacterial isolates in bioremediation of petroleum refinery wastewater. **Jornal of Applied Plytotechnology in Environmental Sanitation**, v.1, p. 131-138, 2012.

HARAYAMA S, KASAI Y, HARA A. Microbial Communities in Oil-contaminated Seawater. **Curr Opin Biotechnol**, v.15, p.205-214, 2004.

HARWATI TU, KASAI Y, KODAMA Y, SUSILANINGSIH D, WATANABE K Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. **Microbes Environ.**, v.22, p.412-415, 2007.

HENRIQUES, M.L.O.F. **Otimização de Biodegradação de Óleo Diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar.** 2013. 162f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013.

HENRIQUES, M.L.O.M.; SILVA, A.M., JARA, A.M.A.T., ANTUNES, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M., ALBUQUERQUE, C.D.C. Bioemulsifier/biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in acid or alkaline seawater with low oxygenation. In: IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. 562, 14-16, 2011.

HYDAYAT, A.; TACHIBANA, S. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon in three types of crude oil by *Fusarium* sp. F092 under Stress with artificial sea water. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, p. 64-73, 2012.

HUANG, L.; MAB, T.; LI, D.; LIANG, F.-L. ; LIU, R.-L.; LI, G.Q. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*, v.56, p. 1714–1718, 2008.

IBAMA. Instrução Normativa nº 5, de 17 de maio de 2010. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/remediadores>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

IBAMA. Remediadores registrados - Junho/2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/category/4?download=7101%3Alista-produtos-remediadores-registrados>>. Acesso em: 02 jul. 2013.

JACQUES, R. J. S.; SANTOS, E.C.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S.; CAMARGO, F. A. O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming site. **Int Biodet Biodeg**, v.56, p.143–150, 2005.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts — the ascomycetes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.9, p. 503-517, 2012.

JOUTEY, N. T.; BAHAFID, W.; SAYEL, H.; GHACHTOULI, N. E. Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. **Biodegradation - Life of Science**, cap. 11, p. 289-320, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/56194>>. Acesso em: 25 jun. 2013.

KALME, S.; PARSHETTI, G.; GOMARE, S.; GOVINDWAR, S. Diesel and Kerosene Degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. **Current Microbiology**, v.56, p.581–586, 2008.

KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. **Asian J. Exp. Biol. Sci**, v. 4, p.1-8, 2013.

KENNEDY, M. J.; PRAPULLA, S. G.; THAKUR, M. S. Designing Fermentation Media: A comparison of Neural Networks to Factorial Design. **Biotechnology Techniques Journal**, v. 6, n.4, p.293-298, 1992.

KISHAN, G.; GOPALAKANNAN, P.; MUTHUKUMARAN, C.; MUTHUKUMARESAN, K. T.; KUMAR, M. D.; TAMILARASAN, K. Statistical optimization of critical medium components for lipase production from *Yarrowia lipolytica* (MTCC 35). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.11, p.111–116, 2013.

KOLESNIKOVAS, C; OLIVEIRA, E. ;DUARTE, URIEL. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada

à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Águas Subterrâneas**, v.23, p.31-44, 2009.

KORDA, A; SANTAS, P.; TENENTE A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 48, p. 677-686, 1997.

LEITÃO A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.6, p. 1393-1417, 2009.

LIMA, C. A. F. **Exploração de petróleo no mar: plano logístico para atendimento ao combate de derramamento de óleo no mar de um campo offshore de produção da Petrobras no estado do espírito santo**. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

LUNA J.M., RUFINO R.D., ALBUQUERQUE C.D.C., SARUBBO L.A., CAMPOSTAKAKI G.G., 2011. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p.2463-2476.

MALIJI, D.; ZAKIA OLAMA, Z.; HANAFY HOLAI, H. Environmental studies on the microbial degradation of oil hydrocarbons and its application in Lebanese oil polluted coastal and marine ecosystem. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v.2, p.1-18, 2013.

MAKKAR R. S, CAMEOTRA S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 58, p. 428-34, 2002.

MARCIEL, C.C.S.; SOUZA, C.S.S.; SILVA, P. A.; SOUSA, M.F.V.Q.; GUSMÃO, N. B. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium sp.* através da bioestimulação. **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, p. 39-42, 2013.

MARTINS, F. F.; FERREIRA, T. F.; AZEVEDO, D. A.; COELHO, M. A. Z. Evaluation of Crude Oil Degradation by *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p.1-6, 2012.

MELO, M.M.C. **Modelagem baseada em Redes Neurais e Meios de Produção de Biossurfactantes**. 85f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

MENEGHETTI, L. R.R. **Bioremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de Passo Fundo/ Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Passo Fundo, 2007.

MENN, F.M.; EASTER, J.P.; SAYLER, G.S. Genetically Engineered Microorganisms and Bioremediation. **Biotechnology Set, Second Edition**, p.441-463, 2008.

MOHAJERI, L.; AZIZ, H. A.; ISA, M. H.; ZAHED, M. A. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. **Bioresource Technology**, v.101, p. 893–900, 2010.

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

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C.; ANDERSON-COOK, C.M. 2009. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, New York.: John Wiley & Sons Inc., 2009.

NAS. **Oil in the Sea III. Inputs, fates, and effects**. The National Academies Press. Washington, EUA, 2003. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=9bHZm\\_9ZtgkC&oi=fnd&pg=PA1&dq=%22Oil+++in+++the+++Sea+++III%22&ots=2UNRTULQu4&sig=4NyZZRbLh4-J84pri1HzNxyWRmk](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=9bHZm_9ZtgkC&oi=fnd&pg=PA1&dq=%22Oil+++in+++the+++Sea+++III%22&ots=2UNRTULQu4&sig=4NyZZRbLh4-J84pri1HzNxyWRmk)> Acesso em: 27 jun. 2013.



NOCENTINI, M., PENILLI, D., PASQUALI, G., FAVA, F., PRANDI, A. Biotreatability and feasibility studies for a bioremediation process of a kerosene contaminated soil. **Proceedings of International Symposium on Environmental Biotechnology**. v. 2, p. 307–310, 1997.

NUNES, P. M. B. **Estudo do efeito do farnesol sobre a morfologia celular de *Yarrowia lipolytica***. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

NUNES, P. M. B.; ROCHA, S. M. da; AMARAL, P. F. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. da. Study of trans–trans farnesol effect on hyphae formation by *Yarrowia lipolytica*. **Bioprocess Biosyst Eng**, p.1-9, 2013.

OKOH A.I., TREJO-HERNANDEZ M.R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. **Afr J Biotechnol**, v.5, p.2520–2525, 2006.

OLIVEIRA, A. A. C. **Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2009.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **Int. J. Mol. Sci**, v.12, p.633-654, 2011.

PAVITRAN, S.; JAGTAP, C.B.; SUBRAMANIAN, S.B.;TITUS, S.;PRADEEP-KUMAR, P; DEB, P.C. Microbial Bioremediation of Fuel Oil Hydrocarbons in Marine Environment. **Defence Science Journal**, v.56, n.2, p.209-224, 2006.

PEDROSA, L. F. **Análise dos mecanismos de planejamento e resposta para incidentes com derramamento de óleo no mar: uma proposta de ação**. 2012. 132 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE, Rio de Janeiro, 2012.

PEDROTI, G.I. Ensaios de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011. doi:10.4061/2011/475193.

POFFO, I. R. F.; GOUVEIA, J.L.N.; HADDAD, E. Acidentes ambientais e comunicação de riscos. II Congresso Brasileiro de Comunicação Ambiental/ **Revista Meio Ambiente Industrial e AG Comunicação Ambiental**. p. 1-12, 2005.

POMBO, F. R. **Gestão da demanda de água na indústria de refino de petróleo: desafios e oportunidades de racionalização**. 2011. 169 f. Tese (Doutorado em Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE, Rio de Janeiro, 2011.

RAMALHO, A. M. Z. **Estudo de reatores eletroquímicos para remoção de Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, fenol e BTEX em água produzida**. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2008.

RYWINSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK, M. Z.; LAZAR, Z. TOMASZEWSKA, L.; WICZ, W. R. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p.148-166, 2013.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1–5, 2011.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, p.1-5, 2014.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, 2011. DOI 10.1007/s11270-010-0536-4.

SEKHON, B. S. Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects. **Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management**, v. 1, p.11–36, 2013.

SILVA, J. F, CAMPOS-TAKAKI, G. M., ALBUQUERQUE, C. D. C. Kerosene biodegradation and biosurfactant production in seawater by the haloalkalitolerant yeast *Candida lipolytica* UCP 0988. In: IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. 562, 14-16, 2011.

SILVA, J. F. **Biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* em água do mar**. 2012. 135f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2012.

SOEMO, A. R. **Microenvironment of monorhamnolipid biosurfactant aggregates and monorhamnolipid effects on aqueous dispersion properties of metal oxide nanoparticles**. Dissertação (Mestrado). 525 f. The University of Arizona/Faculty of the Department of Chemistry & Biochemistry, Arizona, 2013.

SONG H, G., BARTHA, R. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. **Appl Environ Microbiol**, v.56, p.646–651, 1990.

SOUZA, F. A. S. D. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar**. 2009. 175 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUZA, F A. S. D.; SALGUEIRO, A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, p.61-67, 2012.

SUGIURA, K., ISHIHARA, M., SHIMAUCHI, T., HARAYAMA, S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. **Environ. Sci. Technol.** v.31, p.45–51, 1997.

SU, W.-T. ; WU, B.-S.; CHEN, W.-J. Characterization and biodegradation of motor oil by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and optimizing medium constituents. , **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 689–695, 2011.

VANCE-HARROP, M.H.; BUARQUE-GUSMÃO, N.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Braz. J. of Microbiol.**, v.34, p.120-123, 2003.

VARELA, A.; OLIVEIRA, G.; SOUZA JR., F. G.; RODRIGUES e C. H. M.; COSTA, M.A.S. New Petroleum Absorbers Based on Cardanol-Furfuraldehyde Magnetic Nanocomposites. **Polymer Engineering and Science**, v. 53, p. 44-51, 2013.

Von MÜHLEN, C.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (Gcxgc). **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p.765-775, 2006.

## **CAPÍTULO 2**



**Otimização de biodegradação de querosene e produção de biossurfactantes por  
*Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina**

Maria Andreza Bezerra Correia;

Maria Luisa Oliveira Mergulhão Freitas Henriques;

Rivaldo Cassimiro Jr.;

Jupiranan Ferreira da Silva;

Galba Maria Campos-Takaki;

Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Rua Nunes Machado, 42,  
Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050–590, Recife, PE, Brasil.

Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco. Rua do Príncipe,  
526, Boa Vista, CEP- 50.050-900, Recife, PE, Brasil

\*Corresponding author: Tel.:+55 (81) 21194015 Fax: +55 (81) 21194020.

E-mail: [cdaisy@unicap.br](mailto:cdaisy@unicap.br)





## Resumo

Existem relativamente poucos relatos na literatura sobre degradação de hidrocarbonetos por micro-organismos halo-álcali-tolerantes. Neste trabalho, biodegradação de querosene e produção de bioemulsificantes/biossurfactantes (BE/BS) por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo foi investigada. Metodologia de Superfície de Resposta foi aplicada para avaliar os efeitos das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração mássica total, a tensão superficial, o pH e a salinidade. Altos coeficientes de determinação (respectivamente iguais a 0,91; 0,98 e 0,80) e baixos valores  $p$  (menores que 0,05 para a tensão superficial e o pH e menor que 0,10 para a salinidade) mostram a significância dos modelos quadráticos desenvolvidos para tensão superficial, pH e salinidade. A proximidade entre os resultados experimentais e as previsões dos modelos (desvio relativos inferiores a 2,2% para tensão superficial e salinidade e inferiores a 6% para o pH) é um indicativo da confiabilidade dos modelos.

**Palavras chaves:** Metodologia de Superfície de Resposta, biodegradação, querosene, biossurfactante, extremo tolerância.



## **Introdução**

O querosene é um dos produtos de petróleo mais comumente derramados no meio ambiente. Ele contém parafinas (alcanos), cicloparafinas (cicloalcanos), aromáticos e olefinas (Irwin et al., 1997). Além dos riscos de inalação, seu vazamento pode provocar toxicidade aguda tanto para a vida aquática quanto para a terrestre (Saratale et al. 2007). Apesar dos avanços tecnológicos, os derrames acidentais de petróleo e seus produtos refinados ocorrem com frequência durante a extração, armazenamento, transporte, distribuição e processo de refino (Banipal et al., 2003).

A biorremediação natural de oceanos e mares contaminados por hidrocarbonetos é geralmente um processo muito lento. As tentativas para limpar vazamentos de petróleo, com o auxílio de micro-organismos devem levar em consideração as deficiências nutricionais da água do mar, já que a disponibilidade de nitrogênio e de fósforo limita a degradação microbiana de hidrocarbonetos em água do mar (Agarry et al., 2010). Frequentemente, a eficácia da biorremediação é uma função da população microbiana e de como ela pode ser enriquecida e mantida em um determinado ambiente (Boopathy, 2000).

As tecnologias de biorremediação podem ser classificadas como *ex situ* e *in situ*. Tecnologias *ex situ* envolvem a remoção física do material contaminado para processo de tratamento. Em contraste, técnicas *in situ* envolvem tratamento do material contaminado no local (Akpoveta et al., 2011). Em programas de pesquisa com biorremediação *ex-situ*, é possível monitorar e aumentar significativamente a degradação microbiana de petróleo



bruto e seus produtos refinados otimizando condições tais como pH, temperatura, nutrientes, presença de metais e substâncias tóxicas, taxas de transferência de oxigênio e número e estado fisiológico de micro-organismos degradadores de óleo, entre outros (Kumar et al., 2011). A capacidade de várias espécies de *Yarrowia lipolytica* na degradação de diversos compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, é muitas vezes acompanhado por produção biossurfactantes (Coelho et al 2010). *Y.lipolytica* (classificada originalmente como *Candida*) não é apenas de interesse para pesquisa fundamental, mas também para aplicações biotecnológicas. Ela secreta vários metabólitos – entre eles, ácidos orgânicos e proteínas extracelulares - em grandes quantidades (Barth e Gaillardin, 1997) e é uma das bem mais relatadas leveduras para a produção de bioemulsificantes baseados em lipídios-carboidratos-proteína (Sapute et al., 2010). Linhagens tolerantes a sal de *Y. lipolytica* têm sido isoladas de ambientes marinhos e hipersalinos, implicando que este fungo pode exercer um papel significativo em tais ambientes (Kim et al., 2007, Zinjarde et al., 2008).

O crescimento de micro-organismos em hidrocarbonetos é muitas vezes acompanhado pela emulsificação da fonte de carbono insolúvel no meio de cultura. Na maioria dos casos, este achado tem sido associado à produção de agentes emulsionantes extracelulares ou biossurfactantes (Parra, 1990). Geralmente, os compostos tensoativos podem influenciar a biodegradação de hidrocarboneto através do aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos ou podem interferir nas paredes celulares de micro-organismos (Chrzanowski et al., 2006). A formação de emulsões através da produção microbiana e liberação de biossurfactantes é um processo importante na absorção de hidrocarbonetos por bactérias e fungos (Wongsa et

al., 2004). A adição de biossurfactantes aumenta a disponibilidade de hidrocarbonetos de cadeia longa para micro-organismos e os torna mais acessíveis para utilização pelos sistemas enzimáticos microbianos (Atlas e Bartha, 1972; Coelho et al, 2010). Pesquisas são necessárias para desenvolvimento de modelos quantitativos que descrevam simultaneamente processos de biodegradação de hidrocarbonetos e de produção de biossurfactantes em um intervalo amplo de condições ambientais.

Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) baseada em planejamento composto central rotacional tem sido usada com sucesso em modelagem e otimização de processos de biodegradação (Huang et al, 2008; Mohajeri et al., 2010, Zahed et al., 2010) e processos de produção de bioemulsificantes (Albuquerque et al., 2006) e de biossurfactantes (Fontes et al., 2010; Kiran et al , 2010, Luna et al., 2011, Rufino et al, 2008) em ambientes moderados. No entanto, existem poucos estudos sobre a biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactante por leveduras em condições extremas de pH e salinidade (Henriques et al., 2011; Silva et al., 2011; Souza et al., 2012).

No desenvolvimento de processos de biorremediação *ex-situ* de água do mar contaminada por petróleo e derivados, como querosene, o planejamento e a otimização das condições operacionais e de componentes limitantes dos meios de biodegradação de hidrocarbonetos são de importância crítica. Neste trabalho, Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) associada a planejamento composto central (PCC) foi utilizada para otimizar as concentrações de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio em processos de

biodegradação de querosene e de produção de bioemulsificantes/biossurfactantes (BE/BS) por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina.

## 1. Materiais e Métodos

### 1.1. Micro-organismo

*Candida lipolytica* UCP 0998 foi obtida da coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco, Brasil. O micro-organismo foi mantido a 4° C, em tubos de ensaio com o meio YMA (*Yeast Mold Agar*) inclinado, contendo 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de D-glicose, 5 g/L de triptona e 15 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl. Transferências para novas placas com ágar, foram realizadas mensalmente para assegurar a viabilidade celular.

### 2.2. Querosene

Querosene comercializado em postos de gasolina da Companhia de Distribuição Petrobrás (BR), em Recife, Pernambuco, Brasil com as seguintes especificações: máximo de 0.1% de benzeno, mínimo de 70% de hidrocarbonetos parafínicos, máximos de hidrocarbonetos olefínicos e aromáticos, respectivamente iguais a 5 e 20%.

### 2.3. Água do Mar

As amostras de água do mar para os experimentos de biodegradação foram coletadas no Porto de Suape (8° 22' 32,42" S; 34° 57' 11,38" W) a 0,5 m de profundidade da superfície do mar, usando recipientes plásticos de 5L, que foram pré-lavados com água, água destilada e também com água do mar da própria amostra coletada. As amostras foram imediatamente transportadas para o laboratório e filtradas para remover sólidos em suspensão. Sua composição foi Ca<sup>++</sup> 0,48%; Mg<sup>++</sup> 1,36%; Na<sup>+</sup> 11,20%, K<sup>+</sup> 0,55%, Cl<sup>-</sup> 20,00%, SO<sub>4</sub><sup>-3</sup> 3,27%. A salinidade, a gravidade específica, o pH e a tensão superficial foram iguais a 37‰; 1026 kg/m<sup>-3</sup>, 8,22 e 53,43 mN/m, respectivamente.

### 2.4. Determinações Analíticas

Amostras foram coletadas com 0h, 96h e 360 h e determinações de pH, salinidade, gravidade específica, tensão superficial, concentração mássica total e atividades de emulsificação foram realizadas. O pH foi determinado por potenciometria. A salinidade e a gravidade específica por refratometria. A tensão superficial foi determinada pelo método do anel de Dy Noüy (Singh and Cameotra, 2004). A concentração mássica total e a concentração de biomassa foram determinadas por gravimetria. A viabilidade celular foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de acordo com Souza et al. (2012). A atividade de emulsificação foi medida pelo método de Cirigliano e Carman (1984). O método define uma unidade de atividade de emulsificação (UAE) como a quantidade de emulsificante que resulta em uma emulsão com absorvância de 1,0 em 540



nm. O querosene residual foi extraído de acordo Shabir et al. (2008) e a porcentagem de degradação calculada conforme Gouda et al. (2007).

## 2.5. Otimização de Biodegradação de Querosene e de Produção de Biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 em Água do Mar usando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Abordagem baseada em MSR (Myers et al., 2009) foi usada para identificar as concentrações ótimas de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio em processo de biodegradação de querosene 30% (v/v) por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar hipersalina (salinidade superior a 35‰) e extremamente alcalina (pH 14).

Um PCC tendo as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio como fatores ou variáveis independentes, foi delineado com 4 pontos lineares, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central – totalizando 11 ensaios. Os valores das concentrações iniciais de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio e seus intervalos de variação (Tabela 1) basearam-se em resultados de trabalhos anteriores desenvolvidos por Silva (2011) e Cassimiro Júnior (2011). As variáveis respostas avaliadas foram tensão superficial, pH, salinidade, concentração mássica total e atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-milho e água-em-n-hexadecano - selecionadas por serem consideradas indicadores indiretos ou expressões da biodegradação de hidrocarbonetos.

Os componentes dos meios de biodegradação foram pesados, conforme as especificações do PCC (Tabela 1). Após a dissolução dos componentes em água do mar esterilizada, o pH de cada meio foi ajustado para 14. Os meios foram autoclavados a 120° C por 20 minutos, em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL, com volume útil de 750 mL. O inóculo foi obtido a partir de cultura pura de *C. lipolytica* UCP 0988, mantida em 28° C por 48 h. A inoculação foi realizada, em câmara de fluxo laminar, usando 1,33 g/L de biomassa. O querosene foi autoclavado em vapor fluente e adicionado aos meios de biodegradação, na proporção de 30% do volume útil. Os frascos contendo os meios de biodegradação foram incubados em agitador rotatório, durante 15 dias com a temperatura controlada em 28°C e a agitação em 200 rpm. Amostras foram coletadas com 0, 96 e 360 h para determinações de pH, salinidade, biomassa, tensão superficial e atividades de emulsificação para emulsões água-em-n-hexadecano e água-em-óleo-de-milho e para construção dos correspondentes perfis cinéticos.

Modelos empíricos de segunda ordem foram obtidos relacionando as variáveis respostas (parâmetros da otimização) com as variáveis independentes do planejamento de acordo com a equação abaixo:

$$\hat{Y}_r = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j=1, i < j}^1 \sum_{j=2}^2 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad r = 1,2,3 \quad (1)$$

onde  $\hat{Y}$  são as variáveis respostas previstas,  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  and  $\beta_{ij}$  são os coeficientes de regressão referentes ao intercepto e aos termos linear, quadrático e de interação e  $\varepsilon$  é o erro randômico.

As análises estatísticas dos resultados - análises de regressão, de variância e de superfície de resposta - foram realizadas usando o software Statistica versão 8.0 (Statsoft.Inc.,USA). Os valores ótimos das variáveis independentes foram obtidos pela resolução de equações de regressão e também pela análise dos gráficos de superfície de resposta. Os valores previstos foram calculados através das derivadas dos modelos matemáticos obtidos. Os gráficos de linha e de superfície de resposta foram construídos com o apoio do programa SigmaPlot versão 10.0 (Systat software, Inc, Germany)

### **3. Resultados e Discussão**

Nas últimas décadas, vários estudos sobre a influência de nitrogênio e fósforo na biorremediação de ambientes marinhos contaminados com petróleo (Ruiz et al. 2006; Zahed et al, 2010) e sobre biodegradação de querosene em solo, em condições moderadas de pH e salinidade (Agarry et al, 2010; Gouda et al, 2007; Shabir et al, 2008) têm sido desenvolvidos. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência de fontes de nitrogênio e fósforo sobre a tensão superficial, o pH, a salinidade e as concentrações mássica total e de biomassa em processos de biodegradação de querosene produção de biossurfactante/bioemulsificante em água do mar hipersalina e extremamente alcalina. A seguir, são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho, sobre biodegradação de querosene em água do mar em condições extremas de pH e salinidade.

#### **3.1. Perfis cinéticos de tensão superficial, pH, salinidade e concentração mássica total**

Os perfis cinéticos das variáveis resposta tensão superficial, pH, salinidade e concentração mássica total - associadas aos oito ensaios e a média da triplicata do ponto central do planejamento estão ilustrados na Figura 1. Eles mostram a forte influência das fontes de nitrogênio e fósforo sobre o comportamento não linear das variáveis respostas durante o processo de biodegradação de querosene em água do mar hipersalina e extremamente alcalina.

### 3.2. Modelagem Empírica e Análise Estatística

A matriz do PCC tendo como fatores as concentrações iniciais de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio, e os valores das variáveis respostas correspondentes obtidas com 360 h estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados obtidos mostram que *C.lipolytica* UCP 0988 foi capaz de emulsificar e utilizar querosene a 30% (v/v) em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, em condições de alta salinidade e extrema alcalinidade. Os líquidos metabólicos livres de células obtidos produziram atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho variando entre 4.76 e 6.0 UEA, valores comparáveis aos obtidos por Souza et al. (2012), usando óleo diesel a 1%, 3% e 5%, e cujos líquidos metabólicos livres de células obtidos após 168 h produziram atividade de emulsificação para emulsões óleo de milho-em água variando entre 5.45 e 6.0 UAE. Nas condições

investigadas nesse trabalho, a tensão superficial dos líquidos metabólicos livres de células variou entre 35,30 e 41,20 mN/m e a salinidade entre 90 e 95 ‰, enquanto no trabalho de Souza et al (2012) os valores das tensões variaram entre 43,48 e 53,61 mN/m e as salinidades entre 42 e 65 ‰. De acordo com Hagler e Ahearn (1987) muitas leveduras aquáticas são capazes de crescer em concentrações de NaCl excedendo o intervalo normalmente encontrado na água do mar. Estes achados mostram que no presente trabalho, mesmo em condições extremas de pH e salinidade, foram produzidos bons surfactantes em diversos ensaios do PCC, considerando que de acordo com o critério de Habba (2000) bons surfactantes reduzem a tensão superficial para valores inferiores a 40mN/M.

Os resultados obtidos no PCC para a tensão superficial ( $\hat{Y}_1$ ), pH ( $\hat{Y}_2$ ), salinidade ( $\hat{Y}_3$ ) e concentração mássica total ( $\hat{Y}_4$ ), foram ajustados as seguintes equações polinomiais de segunda ordem para investigar suas relações com as concentrações de sulfato de amônio ( $X_1$ ) e fosfato monobásico de potássio ( $X_2$ ):

$$\hat{Y}_1 = \mathbf{4584,440} + 46,058X_1 + 2,899X_1^2 - \mathbf{371,082}X_2 + \mathbf{7,595}X_2^2 - 2,417X_1X_2 \quad (1)$$

$$\hat{Y}_2 = \mathbf{206,543} + 3,973X_1 + 0,200X_1^2 - \mathbf{15,905}X_2 + \mathbf{0,329}X_2^2 - 0,208X_1X_2 \quad (2)$$

$$\hat{Y}_3 = -1806,791 - 99,208X_1 + 0,990X_1^2 + 161,799X_2 - 3,438X_2^2 - \mathbf{4,167}X_1X_2 \quad (3)$$

$$\hat{Y}_4 = -1360,194 + 35,715x - 3,553x^2 + 103,786y - 1,938y^2 - 0,683x*y \quad (4)$$

A significância de cada coeficiente nas equações foi determinada pelo teste *t* de Student e valores *p*. Coeficientes em negrito são estatisticamente significantes no nível de confiança

de 95% ( $p < 0,05$ ). Coeficientes positivos representam efeitos que favorecem a variável resposta investigada, enquanto coeficientes negativos representam efeitos antagônicos. Nos modelos propostos para a tensão superficial ( $\hat{Y}_1$ ) e pH ( $\hat{Y}_2$ ), pode ser visto que a concentração de fosfato monobásico de potássio ( $X_2$ ) exerce efeito mais significativo que a concentração de sulfato de amônio ( $X_1$ ). Esta influência também pode ser observada nos resultados do ensaio 8 - que apresentou as maiores reduções percentuais de tensão superficial e pH - e do ponto central do planejamento que apresentou valores finais de tensão superficial (36.23) e pH (12.58) próximos aos obtidos no ensaio 8 (Fig.1 e Tabela 2). Outros estudos, entretanto, indicam que nitrogênio exerce um efeito mais significativo que fósforo na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (Huang et al, 2008; Vieira et al, 2009; Zahed et al.; 2010). Por outro lado, no modelo proposto para a salinidade ( $\hat{Y}_3$ ), a interação do fósforo com o nitrogênio exerce um efeito inibitório. Possíveis razões para este efeito incluem a inibição direta da atividade metabólica, devido ao alto potencial osmótico desfavorável do ambiente do micro-organismo (Amatya et al., 2002), e a solubilidade alterada ou sorção de íons essenciais ou tóxicos (Ulrich et al., 2009).

As análises de variância mostram que os dois primeiros modelos são significativos para um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), enquanto o terceiro modelo é significativo para um nível de confiança de 90% ( $p < 0,10$ ), como fica evidente dos resultados apresentados na Tabela 3. Os valores- $F$  e os pequenos valores- $p$  dos modelos  $\hat{Y}_1$ ,  $\hat{Y}_2$  e  $\hat{Y}_3$  (menores que 0,05 para os modelos  $\hat{Y}_1$  e  $\hat{Y}_2$  e menores que 0,10 para o modelo 3) indicam as significâncias estatísticas (adequações) dos modelos  $\hat{Y}_1$  e  $\hat{Y}_2$ , no nível de confiança de 95% e a do modelo  $\hat{Y}_3$  no nível de confiança de 90%. Os valores- $F$  da falta de ajuste dos modelos  $\hat{Y}_1$ ,

$\hat{Y}_2$  e  $\hat{Y}_3$  e os grandes valores- $p$  da falta de ajuste (maiores que 0,05 para os modelos  $\hat{Y}_1$  e  $\hat{Y}_2$  e maior que 0,10 para o modelo  $\hat{Y}_3$ ) sugerem que os modelos quadráticos representam adequadamente os dados e que as faltas de ajuste não são significativas em relação ao erro puro. Para testar a qualidade do ajuste dos modelos polinomiais quadráticos, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram avaliados. Quanto mais próximo de 1 é o valor de  $R^2$ , melhor é a correlação entre os valores observados e preditos. O valor  $R^2$  indica a porcentagem da variabilidade (VE) na resposta que pode ser explicada por uma equação de previsão polinomial de segunda ordem. O valor do coeficiente de determinação ajustado ( $R_{adj}^2$ ) também indica a significância do modelo. Os excelentes (superiores a 0,90 e 0,98 para os modelos  $\hat{Y}_1$  e  $\hat{Y}_2$ ) e bom (superior a 0,79 para o modelo  $\hat{Y}_3$ ) valores de  $R^2$  estão em razoável acordo com os coeficientes de determinação ajustáveis  $R_{adj}^2$ . A precisão estatística adequada mede relação sinal-ruído, comparando o intervalo dos valores preditos nos pontos do planejamento com o erro de predição médio. Uma relação maior que 4 é desejável. Os baixos valores dos coeficientes de variação (CV) obtidos pelos modelos indicam uma pequena variabilidade residual e uma confiabilidade maior dos experimentos realizados.

As relações entre as variáveis independentes e as variáveis respostas podem ser entendidas pelo exame das superfícies de respostas (Fig. 2). Entre os modelos propostos, apenas o modelo da concentração mássica total (modelo  $\hat{Y}_4$ ) não pode ser considerado como uma função quadrática das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Uma possível explicação para este resultado pode ser a alta não linearidade do modelo no espaço investigado (Fig.2d) e a conseqüente inadequação do modelo de segunda ordem proposto.

A construção de modelos empíricos baseada na abordagem padrão de MSR frequentemente usa modelos quadráticos derivados de planejamento experimental estatístico. Em alguns casos, a capacidade de um polinômio quadrático aproximar a superfície de resposta verdadeira de um processo pode não ser adequada. Ocasionalmente, para construir um bom modelo de superfície de resposta, polinômios de ordem superior ou outros modelos como redes neurais artificiais são requeridos (Nagata e Chu, 2003). No presente trabalho, o modelo polinomial de segunda ordem para aproximar a superfície de resposta da concentração mássica total foi descartado (Fig. 2d), para evitar entrar em condições sub-ótimas. Entretanto, modelos baseados em redes neurais artificiais podem ser usados futuramente para ajustar os dados experimentais da concentração mássica total.

### 3.2. Validação dos Modelos e Condições Ótimas

Experimentos de validação foram realizados para verificar a precisão dos modelos  $\hat{Y}_1$ ,  $\hat{Y}_2$  e  $\hat{Y}_3$ , e os resultados mostram que os valores preditos estão de acordo com os resultados experimentais. Os valores mínimos para a tensão superficial e para o pH e o valor máximo para a salinidade e as correspondentes composições otimizadas dos meios de biodegradação (concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) previstas dos modelos estão apresentadas na Tabela 4. Experimentos foram realizados para verificar as condições ótimas previstas. Os resultados da tensão superficial, do pH e da salinidade obtidos experimentalmente confirmam os valores previstos e as efetividades dos modelos. De acordo com os resultados obtidos, os erros entre os valores calculados e os valores experimentais obtidos para a tensão e para a salinidade foram inferiores a 2,2% e no caso



do pH foram inferiores a 6%. Conclui-se da Tabela 4 que, nas condições investigadas nos ensaios de biodegradação de querosene do planejamento experimental, a redução da tensão superficial, a redução do pH e o aumento da salinidade (e da concentração mássica total) são favorecidos por concentrações de fosfato monobásico de amônio aproximadamente 10 vezes maiores que as concentrações de sulfato de amônio.

### 3.3. Ensaios Controle de Biodegradação de Querosen em Água do Mar

Para o ensaio com 360 horas de biodegradação de querosene em água do mar, em condições otimizadas (AMQ-PC) - consistindo de água do mar, querosene, sais nutrientes adicionais e inóculo (Fig. 3b) - foram realizados os seguintes ensaios controles: AMQ-CESS - controle abiótico, sem sais nutrientes adicionais, consistindo de água do mar e querosene (Fig. 3a), AMQ-CECS - controle abiótico consistindo de água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais (Fig. 3c), ADQ-CESS - controle abiótico, sem sais nutrientes adicionais, consistindo de água destilada e querosene (Fig.3d), ADQ-PC - controle biótico, consistindo de água destilada, querosene, sais nutrientes adicionais e inóculo (Fig. 3e) e ADQ-CECS - controle abiótico, consistindo de água destilada, querosene e sais nutrientes adicionais (Fig. 3f). Os controles sem sais nutrientes adicionais servem com ponto de referência para biodegradação sob condições sub-ótimas (limitação de nutrientes). Os controles abióticos servem para medir as perdas abióticas (i.e. perdas através de volatilização e dissolução adicional). Os controles usando água destilada no lugar de água do mar servem para monitorar o efeito da salinidade sobre a biodegradação do querosene.

Os efeitos da presença de micro-organismos degradadores de querosene e de sais nutrientes são visíveis nos seis ensaios controles realizados (Fig. 3). Nos ensaios abióticos ADQ-CESS e ADQ-CECS (Fig. 3d e 3f) não ocorreu formação de emulsão entre a água destilada e o querosene, mesmo suplementando a água destilada com sais de N e P. Se por uma lado, a observação do ensaio abiótico AMQ-CESS (Fig. 3a) sugere que os sais de N e P e outros sais existentes em baixas concentrações na água do mar favorecem a formação de emulsões do tipo água do mar-em-querosene, por outro lado, a observação do ensaio abiótico AMQ-CECS (Fig.3c) sugere que a suplementação adequada de sais de N e P aos sais existentes na água do mar, favorece a formação tanto de emulsão do tipo água do mar-em-querosene quanto de emulsão do tipo querosene-em-água do mar. Finalmente, a observação dos ensaios bióticos AMQ-PC e ADQ-PC (Fig. 3b e 3e) sugere que a utilização de concentrações iniciais adequadas de inóculo, a suplementação adequada de sais de N e P - à água do mar ou água destilada - e a formação tanto de emulsão do tipo água do mar-em-querosene quanto do tipo querosene-em-água do mar favorecem a adaptação de *C. lipolytica* UCP 0988 em condições extremas de pH e salinidade e facilitam a utilização de querosene e a produção de emulsificantes e surfactantes pela levedura.

#### 3.4 Perfis Cinéticos de diferentes expressões de biodegradação de querosene em condições otimizadas

Na figura 4 encontram-se ilustrados os perfis cinéticos de tensão superficial, pH, salinidade e concentração mássica (microbiana ou química) determinados em condições

otimizadas. A concentração da biomassa foi obtida como a diferença entre a concentração mássica total do ensaio biótico AMQ\_PC e a concentração mássica de ensaio controle abiótico (AMQ\_CECS). Os perfis cinéticos da Fig. 4a sugerem que, inicialmente, biossurfactante é produzido como metabólito primário – com reduções de tensão superficial e pH – acompanhando a formação de biomassa (cinética associada ao crescimento) e indiretamente a degradação de querosene em água do mar por *C.lipolytica* UCP 0988. De acordo com Rigas et al. (2005), a redução do pH é uma característica biológica de fungos como um esforço para favorecer a oxidação catalítica de substratos e como uma reação ao estresse ambiental causado pela presença de compostos tóxicos. O aumento da tensão superficial e do pH, após 96 h, indicam a inibição de produção de biossurfactante, provavelmente devido a produção de metabólitos secundários.

A levedura pode tolerar níveis elevados de salinidade sob condições de alta alcalinidade e alto teor de querosene durante 360 h. Os resultados sugerem que o nível de salinidade que pode ser tolerado por *C.lipolytica* UCP 0988 em água do mar dependerá não apenas da concentração inicial e da distribuição dos sais nutrientes na água do mar, mas também dependerá das concentrações e distribuições de inóculo, querosene e íons de hidrogênio (pH) na água do mar.

## **Conclusão**

A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 mostrou ser capaz de crescer em água do mar usando querosene como única fonte de carbono e de produzir bioemulsificantes/biossurfactantes em condições extremas de estresse salino e alcalino. Metodologia baseada em Superfície de

Resposta mostrou ser uma abordagem útil para modelagem e otimização de tensão superficial, pH e salinidade em processo de degradação microbiana de querosene em água do mar. A levedura halo-alcáli-tolerante *C.lipolytica* UCP 0988 e seus bioprodutos (bioemulsificantes/biossurfactantes) podem ser úteis para pesquisas teóricas e experimentais sobre mecanismos de múltipla tolerância e biorremediação de petróleo e derivados em água do mar hipersalina e extremamente alcalina.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro (PBPG nº 1143-3.06/11) e à Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pelo uso das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB).

### **References**

Agarry, S.E., Owabor, C.N., Yusuf, R.O., 2010. Studies on Biodegradation of Kerosene in Soil under Different Bioremediation Strategies. *Bioremediat J.* 14, 135-141.

Akpoveta, O.V., Egharevb, A.F., Medjor, O.W., 2011. A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. *Int J Environ Sciences.* 2, 54-67.

Albuquerque, C.D.C, Fileti, A.M.F., Campos-Takaki, G.M., 2006. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol.* 6, 575-583.

Amatya, P.L., Hettiaratchi, J.P.A., Joshi, R.C., 2002. Biotreatment of flare pit waste. *J Can Petrol Technol.* 41, 30–36.

Atlas, R.M, Bartha, R., 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 309-317.

Barth, G., Gaillardin, C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev.* 19, 219-237.

Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour Technol.* 74, 63-67.

Cassimiro Jr., R., 2012. Otimização usando algoritmos genéticos de biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988. Dissertation. Universidade Católica de Pernambuco.105p.

Chrzanowski, L., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2006. The ability of *Candida Maltosa* for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 47-51.

Cirigliano, M. C., Carman, G. M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 48, 747-750.

Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F., Belo, I., 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2, 930-944.

Fontes, G.C., Amaral, P.F.F., Nele, M., Coelho, M.A.Z., 2010. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Biomed. Biotech.* 1-8.

Gouda, M.K., Omar, S.H., Chekroud, Z.A., Eldin, H.M.N., 2007. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. *Chemosphere.* 69, 1807–1814.

Henriques, M.L.O.M.; Silva, A.M., Jara, A.M.A.T., Antunes, A.A.; Campos-Takaki, G.M., Albuquerque, C.D.C., 2011. Bioemulsifier/biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in acid or alkaline seawater with low oxygenation. In: IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. 562, 14-16.

Habba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379-387.

Hagler A.N., Ahearn D.G., 1987. Ecology of aquatic yeasts. In: Rose AH, Harrison JS (ed) The yeasts, vol 2, Yeasts and the environment. Academic, London, pp 181–20.

Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F.L., Liu, R.L., Li, G., 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. Mar. Pollut. Bull. 56, 1714–1718.

Irwin, R.J., Van Mouwerik, M., Stevens, L., Seese, M.D., Basham, W., 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia. Kerosene Entry. National Park Service. Water Resources Division, Water Operating Branch. Oakridge Drive, Suite Fort Collins. 80525.

Kim, J.T., Kang, S.G., Woo, J.H., Lee, J.H., Jeong, B.C., Kim, S.J., 2007. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. Appl Microbiol Biotechnol.74, 820-828.

Kiran, G.S., Thomas, T.A., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. Bioresour Technol. 101, 2389–2396.

Kumar, A., Bisht, B.S, Joshi, V.D, Dhewa, T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. Int J environ sciences. 1, 1079-1093

Luna J.M., Rufino R.D., Albuquerque C.D.C., Sarubbo L.A., Campos-Takaki G.G., 2011. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 2463-2476.

Mohajeri, L., Aziz, H.A., Isa, M.H., Zahed, M.A., 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresour. Technol.* 101, 893–900.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, third ed. John Wiley & Sons Inc., New York.

Nagata, Y., Chu, K.H., 2003. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. *Biotechnol Lett.* 25, 1837–1842.

Parra, J.L., 1990. Studies of biosurfactants obtained from olive oil. *Tenside Surfact.* 27, 302.

Rigas, F.; Dritsa, V.; Marchant,R.; Papadopoulou, K.; Avramides, EJ; Hatzianestis, I., 2005. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via cetral composite design *Environmental Internaational* , 31: 191-195.



Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Neto B.B., Campos-Takaki G.M., 2008. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 35, 907-14.

Ruiz,M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N., 2006. Bioremediation and toxicity determination of natural seawater polluted with weathered crude oil by salt tolerate consortia in a SBR. Mar. Pollut. Bull. 52,1490-1493.

Saratale, G., Kalme, S., Bhosale, S., Govindwar, S., 2007. Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM- 1146. J. Basic Microbiol. 47, 400–405.

Shabir, G., Afzal, M., Anwar, F., Tahseen, R., Khalid, Z.M., 2008. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. Int. Biodeterior Biodegradation. 61, 161–166.

Silva, J.F, Campos-Takaki, G.M., Albuquerque, C.D.C., 2011. Kerosene biodegradation and biosurfactant production in seawater by the haloalkalitolerant yeast *Candida lipolytica* UCP 0988. In: IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. 562, 14-16.

Singh, P., Cameotra, S., 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences, Trends Biotechnol. 22, 142–146.

Souza, F. A. S. D., Salgueiro, A. A., Albuquerque, C. D. C., 2012. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. Braz. J. Chem. Eng. 29, 61 - 67.

Vieira, P.A., Faria, S., Vieira, R.B., De França, F.P., Cardoso, V.L., 2009. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. World J. Microbiol. Biotechnol. 25, 427–438.

Ulrich, A.C., Guigard, S.E, Julia M. Foght, J.M., Semple, K.M., Pooley, K., Armstrong, J.E., Biggar, K.W., 2009. Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. Biodeg., 20:27–38.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., Okuyama, H., 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Curr Microbiol. 49, 415–422 .

Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., Mohajeri, L., Mohjeri, S., 2010. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. Bioresour. Technol. 101, 9455-9060.

Zinjarde, S., Kale, B.V., Vishwasrao, P.V., Kumar, A.R., 2008. Morphogenetic behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. J Microbiol Biotechnol. 18, 1522–1528.

**Tabela 1** - Níveis e intervalos experimentais das variáveis independentes do planejamento composto central

Variável independente	Níveis				
	-1.41	-1	0	1	1.41
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	1.554	1.8	2.4	3.0	3.246
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	23.995	24.2	24.7	25.2	25.405

**Tabela 2** - Matriz das variáveis independentes do planejamento composto central com os resultados experimentais correspondentes para as variáveis resposta com 360h

Ensaio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	pH	ΔpH (%)	Sal (‰)	ΔSal (%)	CMT (g/L)	TS (mN/m)	ΔTS (%)	EAM (UEA)	EAH (UEA)
1	1.8	24.2	12.88	-2.20	95.00	1.06	37.70	39.50	-2.95	5.82	1.23
2	3.0	24.2	12.76	-2.00	90.00	0.00	33.32	41.20	-1.20	4.76	4.93
3	1.8	25.2	12.85	-1.91	95.00	5.56	47.50	39.40	-2.48	0.69	2.05
4	3.0	25.2	12.48	-1.73	95.00	2.15	42.30	38.20	-4.98	6.00	5.36
5	1.554	24.7	12.9	-2.20	95.00	1.06	40.78	37.60	-0.27	5.35	3.08
6	3.246	24.7	12.53	-2.87	95.00	0.00	53.62	38.20	-1.29	4.93	4.99
7	2.4	23.995	12.86	-2.13	93.00	-2.11	46.36	40.90	12.67	6.00	1.96
8	2.4	25.405	12.61	-3.07	95.00	0.00	51.20	38.30	-13.93	6.00	3.30
9	2.4	24.7	12.56	-0.87	95.00	4.40	45.04	35.30	0.28	4.89	2.30
10	2.4	24.7	12.55	-3.39	96.00	2.13	49.44	36.30	-9.93	4.89	1.00
11	2.4	24.7	12.63	-2.85	95.00	3.26	42.96	37.10	-5.36	5.18	3.19
MPC	2.4	24.7	12.58	-2.37	95.33	3.26	45.81	36.23	-4.99	4.99	2.88
DPPC	0.0	0.0	0.04	1.33	0.58	1.13	3.31	0.90	5.11	0.17	1.93

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Sulfato de Amônio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- Fosfato Monobásico de Potássio pH - Potencial Hidrogeniônico Δ- Mudança em Sal - Salinidade TS - Tensão Superficial CMT - Concentração Mássica Total AEM, AEH - Atividade de Emulsificação para emulsões água em óleo de milho e água em n-hexadecano MPC-Média do Ponto Central DPPC- Desvio Padrão do Ponto Central

**Tabela 3** -Resultados de Análises de Variâncias para o planejamento Composto Central

Resposta	F <sub>mod</sub>	F <sub>FAN</sub>	p <sub>AM</sub>	P <sub>FAN</sub>	F <sub>mod</sub> /F <sub>tab</sub>	F <sub>FAN</sub> /F <sub>TAB</sub>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub>	VE	CV
$\hat{Y}_1$	9.95	0.56	0.0123824	0.6922496	1.97	19.16	0.9087	0.8173	0.9562	0.0058
$\hat{Y}_2$	52.86	0.17	0.0002502	0.9106616	10.47	0.01	0.9814	0.9629	0.9962	0.0016
$\hat{Y}_3$	3.89	4.80	0.0812558	0.1771603	0.77	0.25	0.7954	0.5908	0.8157	0.0020
$\hat{Y}_4$	0.39	7.15	0.836246	0.1251381	0.08	0.37	0.2818	0.000	0.3001	0.0092

$\hat{Y}_1$ -Tensão Superficial  $\hat{Y}_2$ -pH  $\hat{Y}_3$ -Salinidade  $\hat{Y}_4$ - Concentração Mássica Total  $F_{mod}$ -Valor F do Modelo  $F_{FAN}$ - Valor F da Falta de Ajuste  $F_{FAN}/F_{TAB}$ -Relação Valor F do Modelo/Valor F da Falta de Ajuste  $R^2$  - Coeficiente de Determinação  $R^2_{adj.}$ - Coeficiente de Determinação Ajustado VE-Variabilidade Explicada CV-Coeficiente de Variação

**Tabela 4** – Valores críticos (máximo ou mínimo) das variáveis respostas previstas pelos modelos polinomiais quadráticos e as correspondentes concentrações ótimas de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio

Variável Resposta	Valores Ótimos Previstos	Valores Ótimos Experimental	Desvio Relativo (%)	Composição Ótima Prevista	
				$X_1$ : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	$X_2$ : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)
$\hat{Y}_1$ : Tensão Superficial (mN/m)	36.13536	35.36±0.37	2.19	2.39791	24.81136
$\hat{Y}_2$ : pH	12.45478	13.24±0.93	5.93	3.18901	25.20270
$\hat{Y}_3$ : Salinidade (‰)	95.59697	97.67±3.29	2.12	2.13647	24.82548

## Legendas das Figuras

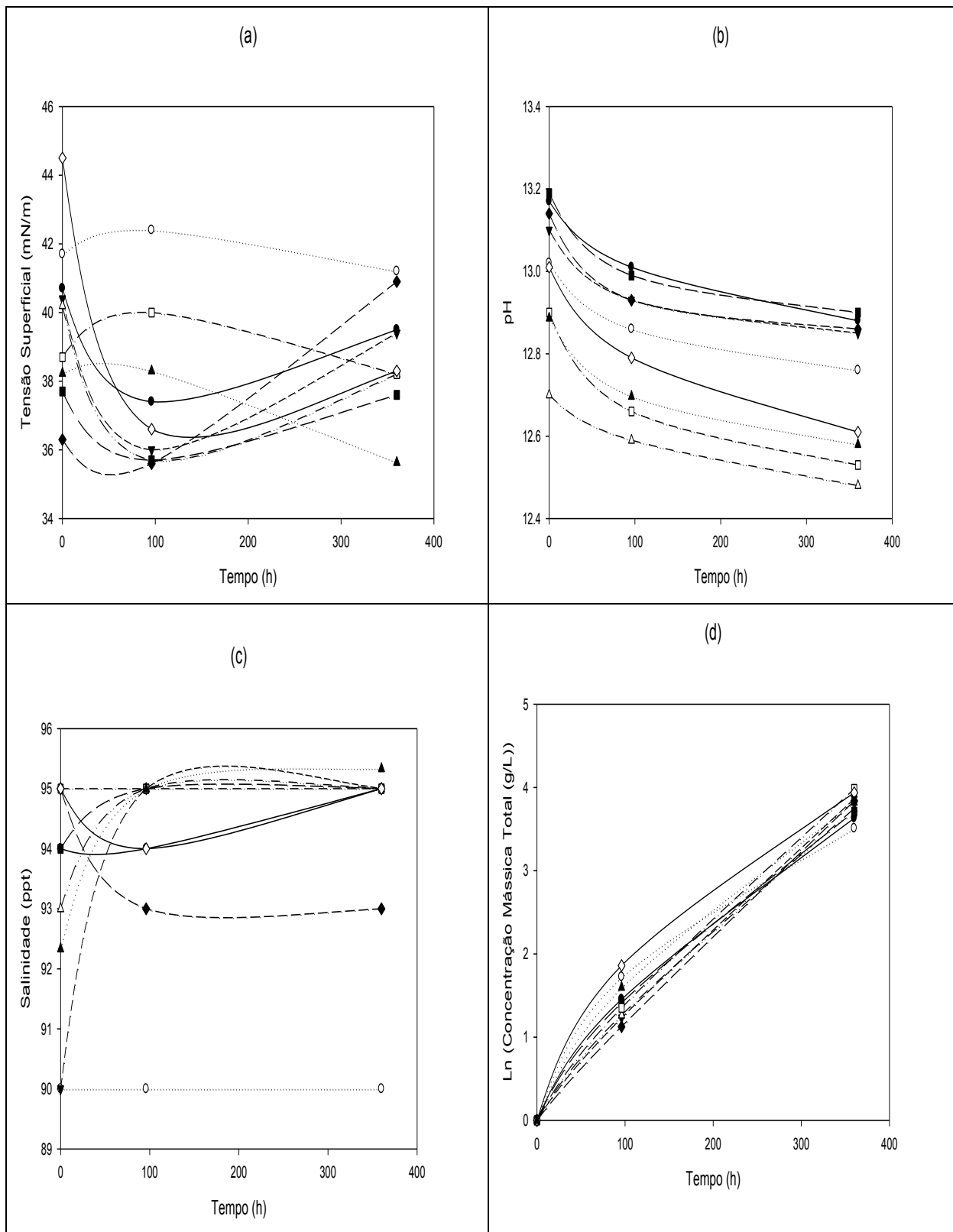
**Fig.1.** Perfis cinéticos de tensão superficial, pH, salinidade e concentração mássica total para os 8 ensaios (● Ensaio 1, ○ Ensaio 2, ▼ Ensaio 3, △ Ensaio 4, ■ Ensaio 5, □ Ensaio 6, ◆ Ensaio 7 e ◇ Ensaio 8) e a média da triplicata do ponto central (▲ Média dos Ensaios 9, 10 e 11) do planejamento central composto.

**Fig.2.** Gráficos de Superfícies de Resposta mostrando - com 360 h- os efeitos das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre: (a) Tensão Superficial, (b) pH, (c) Salinidade e (d) Concentração Mássica Total.

**Fig.3.** Biodegradação de Querosene em Água do Mar com 360 h: (a) AMQ-CESS- controle abiótico, sem sais nutrientes adicionais, consistindo de água do mar e querosene, (b) AMQ-PC- ensaio biótico, realizado em condições otimizadas, consistindo de inóculo, água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais, (c) AMQ-CECS- controle abiótico consistindo de água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais, (d) ADQ-CESS- controle abiótico, sem sais nutrientes adicionais, consistindo de água destilada e querosene, e) ADQ-PC controle biótico, consistindo de inóculo, água destilada, querosene e sais nutrientes adicionais e (f) ADQ-CECS- controle abiótico consistindo de água destilada, querosene e sais nutrientes adicionais.

**Fig.4.** Biodegradação de Querosene em Água do Mar: (a) Perfis cinéticos do pH (◇), da tensão superficial (△), da salinidade (□) e da concentração mássica total (○) para o ensaio realizado em condições otimizadas (AMQ-PC), (b) Perfil cinético da tensão superficial (△), pH (◇), salinidade (□) e concentração mássica total (○) para o controle estéril consistindo de água do mar, querosene e sais nutrientes adicionais (AMQ-CECS).



**Fig. 1.**

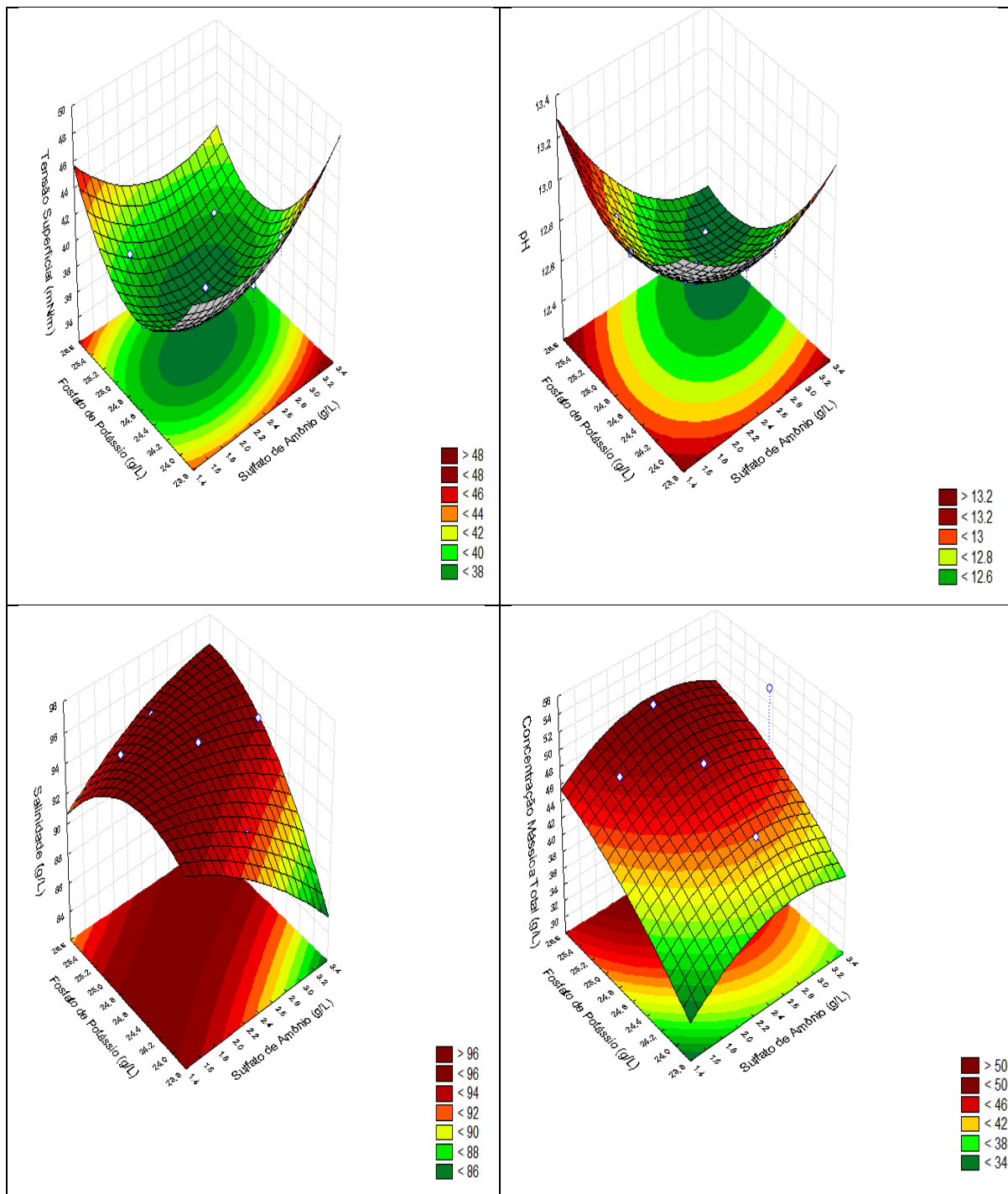
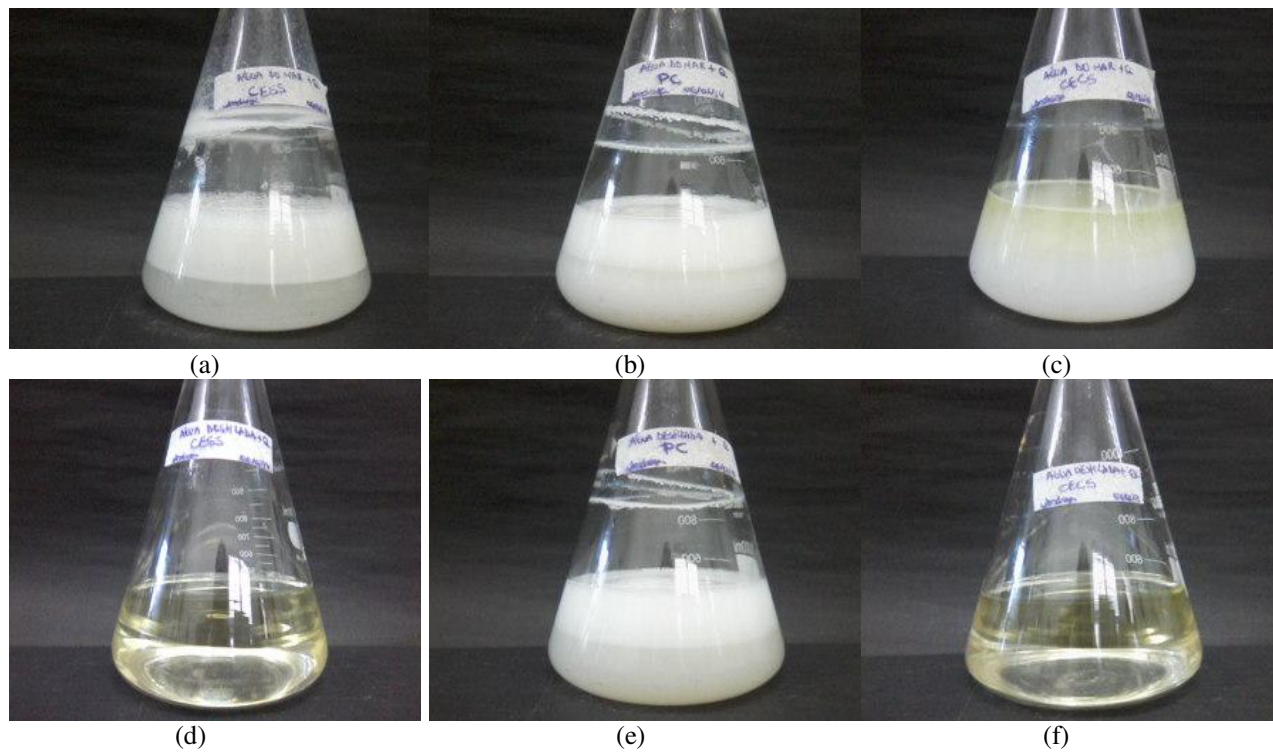


Fig. 2.



**Fig. 3.**

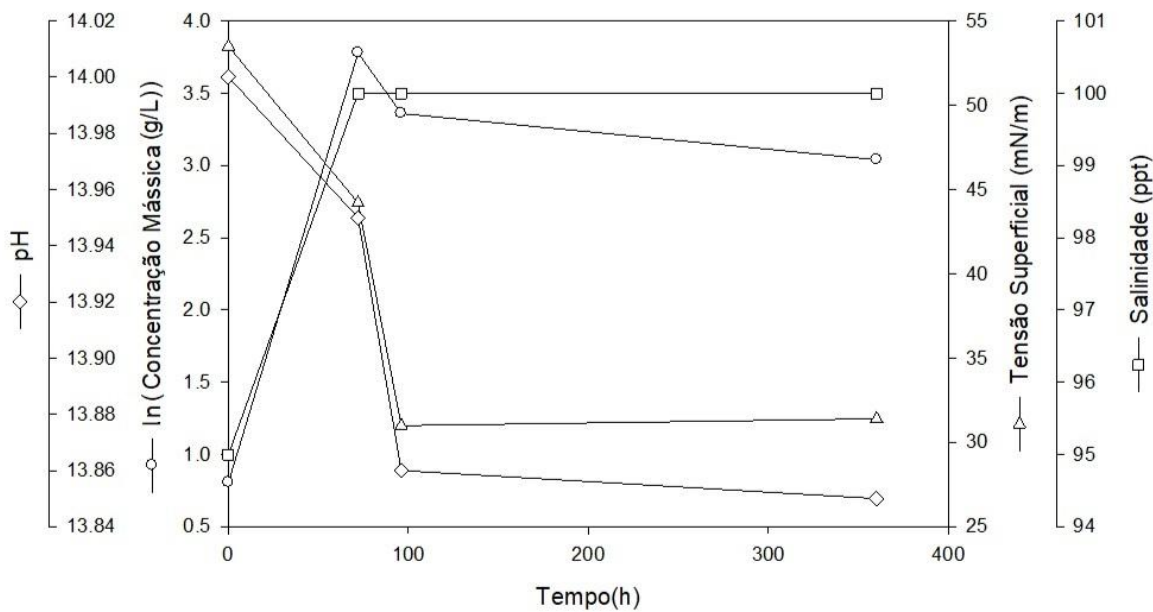
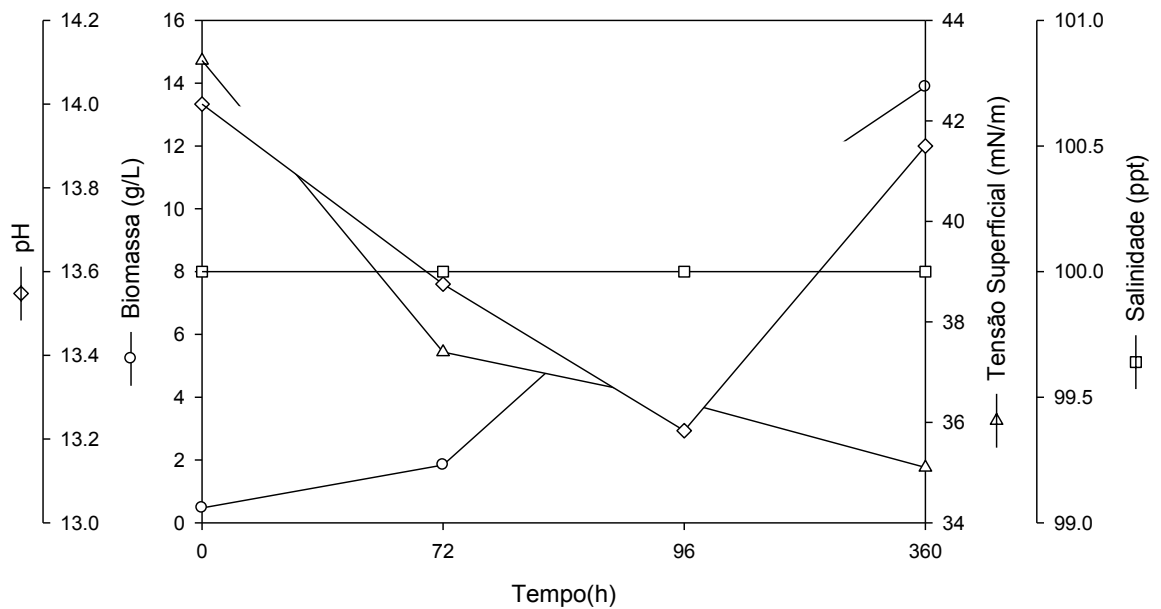


Fig. 4

## **CAPÍTULO 3**

## Considerações Finais

- A levedura *Candida lipolytica* é capaz de degradar querosene em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato de potássio e produzir BE/BS com potencial de uso em biorremediação.
- A água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo é um meio eficiente e de baixo custo para produção de BE/BS.
- A abordagem baseada em MSR adotada para otimização da tensão superficial, pH e salinidade do processo de biodegradação de querosene e produção de BE/BS em água do mar hipersalina e extremamente alcalina é eficiente, simples e econômica.
- Como trabalhos futuros são sugeridos a realização da purificação e identificação dos produtos microbianos e químicos formados durante a biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente alcalina e a aplicação de redes neurais artificiais para modelar o processo de biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar.

**Comprovante de Submissão do artigo  
para a Revista Bioresource  
Technoogy**

Zimbra

cdaisy@unicap.br

**Submission Confirmation****De :** Bioresource Technology <bite@elsevier.com>

Qui, 27 de Fev de 2014 16:51

**Remetente :** ees bite 0 278f9a ca093cf5

&lt;ees.bite.0.278f9a.ca093cf5@eesmail.elsevier.com&gt;

**Assunto :** Submission Confirmation**Para :** cdaisy@unicap.br, albqqs@yahoo.com.br

Bioresource Technology

Title: Optimization of kerosene biodegradation and biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in hypersaline and extremelly alkaline seawater

Authors: Clarissa Daisy Costa Albuquerque, Ph.D; Maria Andreza B; Maria Luisa Oliveira Mergulhão F Henriques; Rivaldo Cassimiro Jr.; Galba Maria C Takaki, DSc

Article Type: Original research paper

Dear Clarissa,

We have received your article "Optimization of kerosene biodegradation and biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in hypersaline and extremelly alkaline seawater" for consideration for publication in Bioresource Technology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/bite/>

2. Enter these login details:

Your username is: cdaisy@unicap.br

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/BITE/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/BITE/automail_query.asp).

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Please do not hesitate to contact me if you have any queries.



# **Normas da Revista Bioresource Technology**



### TABLE OF CONTENTS

• <b>Description</b>	<b>p.1</b>
• <b>Audience</b>	<b>p.1</b>
• <b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
• <b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
• <b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
• <b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0960-8524

### DESCRIPTION

*Biorresource Technology* publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of biorresource technology.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and biorresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the [Subject Classifications](#) in the [Guide for Authors](#).

The Journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

### AUDIENCE

Biotechnologists, applied microbiologists, chemical and biochemical engineers, process technologists, agro-industrial waste management technologists.

### IMPACT FACTOR

2010: 4.365 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

### AGRICOLA

Agricultural Engineering Abstracts

Analytical Abstracts (Royal Society of Chemistry Information Services)

BIOSIS

Biology and Environmental Sciences

CAB Abstracts

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBASE

Ecological Abstracts

Energy Information Abstracts

Energy from Biomass and Municipal Wastes

Engineering Index

Environmental Periodicals Bibliography

Forestry Abstracts

Fuel and Energy Abstracts

GEOBASE

Gas Abstracts

SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

Selected Water Resources Abstracts

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**A. Pandey**, Biotechnology Division, National Inst. for Interdisciplinary Science & Technology, CSIR, Trivandrum 695 019, India, Fax: +91 471 2 49 17 12, Phone +91 471 2 51 52 79

### *Editor*

**R.D. Joerger**, Dept. of Animal and Food Sciences, University of Delaware, 033 Townsend Hall, Newark, DE 19717-1303, USA

**C. Larroche**, Biochemical Engineering Dept, Université Blaise Pascal, F-63174 Aubière, France

**H.H. Ngo**, Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Building 2, Level 5, GPO Box 123, Broadway, NSW 2007, Australia

### *Associate Editors*

**D.-J. Lee**, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

**J.M. Park**, Pohang University of Science and Technology, Pohang, South Korea

**R. Anderson**, Southern Plains Agricultural Research Center, College Station, TX, USA

### *Editorial Board*

**R.D. Ashby**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Wyndmoor, PA, USA

**S. Barrington**, McGill University, Quebec, QC, Canada

**A. Bergel**, Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse, France

**R.G. Berger**, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

**R. Boopathy**, Nicholls State University, Thibodaux, LA, USA

**C.A. Cardona**, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Manizales, Caldas, Colombia

**G.R. Castro**, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

**P. Champagne**, Queen's University, Kingston, ON, Canada

**J.-S. Chang**, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, ROC

**C. Dosoretz**, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

**C.-G. Dussap**, Université Blaise Pascal, Aubière, France

**E. Favela-Torres**, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., Mexico

**E. Gnansounou**, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

**P.C. Hallenbeck**, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

**J.V. Jagathesan**, Deakin University, Geelong, VIC, Australia

**S.V. Kalyuzhnyi**, Russian Corporation of Nanotechnology, Moscow, Russian Federation

**A. Kondo**, Kobe University, Kobe, Japan

**M.R. Ladisch**, Purdue University, West Lafayette, IN, USA

**J.-S. Lee**, Korea Institute of Energy Research, Daejeon, South Korea  
**B.E. Logan**, Penn State University, PA, USA  
**D. Madamwar**, Sardar Patel University, Vallabh Vidyanagar, India  
**J.C. Parajó**, Universidad de Vigo, Lugo, Ourense, Spain  
**J. Pruvoat**, Université de Nantes, Saint-Nazaire Cedex, France  
**K.B. Ramachandran**, Indian Institute of Technology Madras, Chennai, India  
**H.W. Ryu**, Chonnam National University, Gwangju, South Korea  
**S. Saka**, Kyoto University, Kyoto, Japan  
**M.A. Sanroman**, Universidad de Vigo, Vigo, Spain  
**E. Santacesaria**, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy  
**T. Satyanarayana**, University of Delhi, New Delhi, India  
**M.W. Schläpman**, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg, Germany  
**C.R. Soccol**, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil  
**L. Szpyrkowicz**, Università Ca'Foscari Venezia, Venezia, Italy  
**A. Sánchez**, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain  
**M. Taherzadeh**, University of Borås, Borås, Sweden  
**K.T. Lee**, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia  
**R.D. Tyagi**, INRS, Quebec, QC, Canada  
**C. Viavanathan**, Asian Institute of Technology, Klongkruang, Pathumthani, Thailand  
**P. Welmer**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), West Madison, WI, USA  
**J.W.C. Wong**, Hong Kong Baptist University, China  
**H.-Q. Yu**, University of Science & Technology of China, Anhui, China

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

*Bioresource Technology* publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of bioresource technology.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and bioresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the [Subject Classifications](#) in the Guide for Authors.

The journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

#### *Types of paper*

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found [here](#)

#### *Submission of papers:*

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>

#### *Covering letter to the editor:*

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors and select the most suitable ONE ONLY).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/findings, or significance of results.

*Types of contributions:* Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews. Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor by sending the extended summary (300-400 words), outline and the list of publications of authors on the topic.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsinterest>.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have

entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### *Language and language services*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). The Editors suggest avoidance of usage of first person (we, us, our) in the text. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Please note that poor language may cause the rejection of the manuscript.

#### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/biotech>.

#### *Referees*

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The Executive Editor first evaluates all manuscripts on technical aspects such as compliance to the Guide for Authors, quality of grammar or English language. Revision can be requested. Manuscripts accepted at this stage are passed to the handling editor who can also reject on the basis of insufficient originality, serious scientific flaws, or because the work is considered outside the aims and scope of the journal. Those that meet the minimum criteria are passed on to experts for review. Referees advise the editor, who is responsible for the final decision to accept or reject the article. **Please note:** Any Editor's decision is final.

Manuscripts previously rejected by the Journal will not be re-considered by the Editors, and therefore will be rejected without review.

## **PREPARATION**

### *Manuscript Preparation*

#### *General:*

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity.

#### *Structure:*

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

#### *Text Layout:*

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

**Page length:** Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

#### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

#### **LaTeX**

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

#### **Article structure**

##### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing; do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

##### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

##### **Experimental**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

##### **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

##### **Results and Discussion**

Results should be clear and concise, and be part of a single section, discussing the significance of the results of the work, not repeat them. Extensive citation and discussion of the published literature should be avoided.



### Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (maximum 100 words).

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding**

**the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6. The Journal discourages publication of simple one line graphs/figures, pattern figures, conventional spectra (X-ray, FTIR, UV, NMR, etc) and SEM photographs of a routine nature.

#### *Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

#### *References*

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically, THEN NUMBERED NUMERICALLY, and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

#### Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

#### Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.; Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

#### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lj.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.isan.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

#### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/D016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

#### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

##### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### *Publication of Articles*

After acceptance the Journal will publish articles quickly both online and in print. Requests for delayed publication of the accepted articles are generally not acceptable.

### *Proofs*

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### *Offprints*

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

## AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.



© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

1  
2





**Artigo submetido à Revista  
Bioresource Technology**



**Optimization of kerosene biodegradation and biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in hypersaline and extremely alkaline seawater**

Maria Andreza Barreto Correia;

Maria Luisa Oliveira Mergulhão Freitas Henriques;

Rivaldo Cassimiro Jr.;

Jupiranan Ferreira da Silva;

Galba Maria Campos-Takaki;

and Clarissa Daisy da Costa Albuquerque\*

Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050–590, Recife, PE, Brazil

Center of Sciences and Technology, Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, CEP , Recife, PE, Brazil

\*Corresponding author: Tel.:+55 (81) 21194015 Fax: +55 (81) 21194020.

E-mail: [cdaisy@unicap.br](mailto:cdaisy@unicap.br)

**Abstract**

There are relatively few reports in the literature about hydrocarbon degradation in seawater by haloalkalitolerant microorganisms. In this work, kerosene biodegradation and bioemulsifiers/biosurfactants (BE/BS) production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in hypersaline and extremely alkaline seawater, supplemented with nitrogen and phosphorus sources was investigated. Response surface methodology was applied to evaluate the effect of variables namely ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic on the increase of biomass concentration, surface tension, pH e salinity. High correlation coefficients for the models of surface tension, pH and salinity (respectively equal to 91 %, 98% and 80% ) and low  $p$  values (less than 0.05 for surface tension and pH and less than 0.10 for salinity) demonstrate the significance of the regression equations. The closeness of the experimental results and model predictions (relative deviations less than 2 % for surface tension and salinity and less than 6 % for pH ) show the reliability of the models.

**Keywords:** Response Surface Methodology, biodegradation, kerosene, biosurfactant, extremotolerance.

## 1. Introduction

Kerosene is one of the most commonly spilled petroleum products in the environment. It contains paraffins (alkanes), cycloparaffins (cycloalkanes), aromatics and olefines (Irwin et al., 1997). Its spill could cause potential acute toxicity to both aquatic and terrestrial life as well as inhalation hazards (Saratale et al. 2007). Despite technology advances, accidental spills of crude oil and its refined products occur frequently during extraction, storage, transportation, distribution, and refining process (Banipal et al., 2003).

Natural bioremediation of oceans and seas contaminated by hydrocarbons is generally a very slow process. Attempts to clean up oil spills with the aid of microorganisms should take into consideration the nutritional deficiencies of sea water. It is well established that the availability of nitrogen and phosphorus limits the microbial degradation of hydrocarbons in seawater (Agarry et al., 2010). The effectiveness of bioremediation is often a function of the microbial population and how they can be enriched and maintained in an environment (Boopathy, 2000).

The ascomycetous yeast *Yarrowia lipolytica* is one of the more intensively studied "non-conventional" species. The species was originally classified as a *Candida*, since no sexual state had been described. The perfect form was reclassified first as *Endomycopsis lipolytica*, then as *Saccharomycopsis lipolytica* and finally as *Yarrowia lipolytica*. *Y.lipolytica* is not only of interest for fundamental research, but also for biotechnological applications. It secretes several metabolites in large amounts (i.e.

organics acids, extracellular proteins) and the tools are available for overproduction and secretion of foreign proteins (Barth and Gaillardin, 1997). The ability of many species of *Y. lipolytica* in degradation a variety of organic compounds, including aliphatic and aromatic hydrocarbons, is often accompanied by biosurfactants production (Coelho et al 2010). *Y. lipolytica* is one of the well reported yeast for production of lipid-carbohydrate-protein based bioemulsifiers (Sapute et al., 2010). Salt tolerant strains of *Y. lipolytica* have been isolated from hypersaline and marine locations implicating that this fungus may be playing a significant role in such environments (Kim et al. 2007, Zinjarde et al., 2008).

The growth of microorganisms on hydrocarbons is often accompanied by the emulsification of the insoluble carbon source in the culture medium. In most cases, this has been due to the production of extracellular emulsifying agents or biosurfactants (Parra, 1990). Generally, surface-active compounds may influence hydrocarbon biodegradation by increasing the solubility of hydrocarbons or they may interfere with the cell walls of microorganisms (Chrzanowski et al., 2006). The formation of emulsions through the microbial production and release of biosurfactants is an important process in the uptake of hydrocarbons by bacteria and fungi (Wongsa et al., 2004). Addition of biosurfactants increases the availability of long chain hydrocarbons to microbes and renders them more accessible to microbial enzyme systems for utilization (Atlas and Bartha, 1972; Coelho et al., 2010). Researches are needed to develop quantitative models that describe the simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production processes under a wide range of environmental conditions.

Bioremediation technologies can be broadly classified as *ex situ* and *in situ*. *Ex situ* technologies involve the physical removal of the contaminated material for treatment process. In contrast, *in situ* techniques involve treatment of the contaminated material in place (Akpoveta et al., 2011). In *ex-situ* bioremediation research program, it is possible to monitor and significantly increase microbial degradation of crude oil and its refined products by optimizing conditions such as pH, temperature, nutrients, presence of metals and toxics, oxygen transfer rates and number and physiological state of oil degrading microbes, among others (Kumar et al., 2011).

The Response Surface Methodology (RSM) based on central composite rotatable design has been used successfully to model and optimize biodegradation process (Huang et al., 2008; Mohajeri et al., 2010, Zahed et al, 2010), and bioemulsifier (Albuquerque et al., 2006) and biosurfactant (Fontes et al., 2010; Kiran et al., 2010) production processes, in moderate environments. However, there are very few reports on simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by yeast in extreme conditions of pH and salinity (Henriques et al., 2011; Silva et al, 2011; Souza et al., 2012).

In developing of *ex-situ* bioremediation process, designing and optimization of biodegradation media is of critical importance. Therefore, in this work the response surface methodology (RSM) was adopted to investigate the optimal concentrations of ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic that maximize simultaneously the *ex-situ* kerosene biodegradation and bioemulsifiers/biosurfactants (BE/BS) processes by *Candida lipolytica* UCP 0988 in hypersaline and extremely alkaline seawater.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Microorganism

*Candida lipolytica* UCP 0998 was obtained from the culture collection of Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil, registered in the World Federation of Culture Collection. The microorganism was maintained at 5 °C on Yeast Mold Agar (YMA) slants containing (w/v): yeast extract (3g), malt extract (3g), tryptone (5g), D-glucose (10g) and agar (5g), pH5. Transfers were made to agar slants each month to maintain viability.

### 2.2. Kerosene

Kerosene purchased from a local Petrobras Distributing Company's (BR) gas station, in Recife, Pernambuco, Brazil with the specifications: maximum of 0.1% benzen, minimum of 70% paraffinic hydrocarbons and maximum of olefinic and aromatic hydrocarbons, respectively equal to 5 and 20%.

### 2.3. Sea Water

Sea water samples for biodegradation experiments were collected in Suape Harbor (8° 22' 32,42" S; 34° 57' 11,38" W) at 0,5 m depth under the surface of the sea, using 5L plastic containers, which were prewashed with water, distilled water, as well as with the water



sample itself. Samples were immediately transported to the laboratory and filtered to remove suspended solids. Its composition was  $\text{Ca}^{++}$  0.48%;  $\text{Mg}^{++}$  1.36%;  $\text{Na}^+$  11.20%,  $\text{K}^+$  0.55%,  $\text{Cl}^-$  20.00%,  $\text{SO}_4^-$  3.27%. The salinity, specific gravity, pH and surface tension were equal to 37‰;  $1026 \text{ kg/m}^{-3}$ , 8.22 and 53.43 mN/m, respectively.

#### 2.4. Analytical determinations

Samples were taken every 0h, 96h and 360 h and pH, salinity, specific density, surface tension, biomass concentration and emulsification activity were assayed off-line. The pH was determined by potentiometry. The salinity and the density were determined by refractometry. The surface tension was determined by the ring method of du Noüy (Singh and Cameotra, 2004). Biomass was determined by the extractive-gravimetric method. The emulsification activity of cell free broth was measured by method of Cirigliano and Carman (1984). The method defines one unit of emulsification activity (UEA) as the amount of emulsifier that resulted an emulsion with an absorbance of 1.0 at 540nm. The residual kerosene was extracted according to Shabir et al. (2008). The degradation percent was calculated by subtracting the kerosene content of the untreated sample from the residual kerosene, after dividing by the kerosene of the untreated sample and multiplying by hundred (Gouda et al., 2007).

#### 2.5 Optimization of Kerosene Biodegradation using Response Surface Methodology

Response Surface Methodology (RSM) approach (Myers et al, 2009) was used to identify the optimum concentrations of ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic

for a process of kerosene biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater hypersaline (salinity greater than 35‰) and extremely alkaline (pH initial 14).

A central composite design (CCD) using these two factors or independent variables was designed with four linear points, four star points, and three replicates at the center points leading to 11 runs (Table 1). The initial pH (14), the initial kerosene concentration (30%) and the initial levels of the independent variables (Table 1) were chosen based on the results of the previous works carried out by Silva (2011) and Cassimiro Jr. (2012). The responses variables evaluated were biomass concentration, surface tension and pH after 15 days of biodegradation process and were selected because they are indirect indicator or expressions of the hydrocarbon biodegradation. Empirical models were obtained relating the responses variables with the independent variables, according to the equation below:

$$\hat{Y}_r = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j=1, i < j}^1 \sum_{j=2}^2 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad r = 1, 2, 3 \quad (1)$$

where  $\hat{Y}$  are the predicted responses variables,  $X_i$  and  $X_j$  are the coded independent variables,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  and  $\beta_{ij}$  are the regression coefficients for the intercept, linear, quadratic and interaction terms and  $\varepsilon$  is the random error.

The biodegradation media components were weighed according to the CCD specifications (Table 1). Natural sea water was used as diluent. Kerosene at 30% (v/v) - sterilized by flowing steam - was used as the sole carbon source and added after sterilization of the media- by autoclaving at 120°C for 20 minutes. The experiments were

conducted in Erlenmeyer flasks of 1000 mL - having a working volume of 750 mL - inoculated with 1.333 g/L de biomass and incubated on a rotatory shaker at 200 rpm and 28 °C, during 15 days. The initial pH of the media was 14 and was left uncontrolled throughout the kerosene biodegradation process. Samples were collected and used for biomass, pH, surface tension and emulsification activity measurements.

The Statistica software version 8.0 (Statsoft.Inc.,USA) was used for regression, variance and graphical analysis of the experimental data. The optimum values of independent variables were obtained by solving the regression equations and also by analyzing the response surface contour plots. The predicted values were calculated by using the mathematical model derived. The SigmaPlot for Windows software version 10.0 (Systatsoft,Inc.) was used to create the line plots and the response surface contour plots.

## **2. Results and discussion**

In the last decade, several studies have been conducted about kerosene biodegradation in soil under moderate conditions of pH and salinity (Agarry et al, 2010; Gouda et al, 2007; Shabir et al, 2008). However, little is know about the kerosene biodegradation in seawater hypersaline and extremely alkaline. In the following are presented the results of a exploratory research, conducted - in laboratory scale and with aid of mathematical

modeling - to evaluate the kerosene biodegradation feasibility and associated activity of the yeast *C. lipolytica* UCP 0988, in extreme conditions of pH and salinity.

### 3.1. Kinetic profiles of surface tension, pH, salinity and total massic concentration

The kinetic profiles of four responses variables - considered in this work as expression of kerosene biodegradation - surface tension, pH, salinity and total massic concentration - associated to the 8 runs and the mean of the triplicate of the center point of the CCD are illustrated in Figure 1. The time course profiles allow to analyse of the different expressions of kerosene biodegradation in seawater hypersaline and extremely alkaline.

### 3.2. Empirical Modeling and Statistical Analysis

RSM approach was used to identify the optimum ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations for 35% kerosene biodegradation in sea water hypersaline and extremely alkaline. The medium components affecting kerosene biodegradation were optimized using CCD. The experimental runs carried out and the observed responses with 360 h are presented in Table 2.

The results obtained for surface tension ( $\hat{Y}_1$ ), pH ( $\hat{Y}_2$ ), salinity ( $\hat{Y}_3$ ) and massic concentration ( $\hat{Y}_4$ ), were fitted to the following second order polynomial equations to investigate their dependences on the ammonium sulfate ( $X_1$ ) and potassium phosphate monobasic ( $X_2$ ) concentrations:

$$\hat{Y}_1 = \mathbf{4584.440} + 46.058X_1 + 2.899X_1^2 - \mathbf{371.082}X_2 + \mathbf{7.595}X_2^2 - 2.417X_1X_2 \quad (1)$$

$$\hat{Y}_2 = \mathbf{206.543} + 3.973X_1 + 0.200X_1^2 - \mathbf{15.905}X_2 + \mathbf{0.329}X_2^2 - 0.208X_1X_2 \quad (2)$$

$$\hat{Y}_3 = -1806.791 - 99.208X_1 + 0.990X_1^2 + 161.799X_2 - 3.438X_2^2 - \mathbf{4.167}X_1X_2 \quad (3)$$

$$\hat{Y}_4 = 4584.440 + 46.058X_1 + 2.899X_1^2 - 371.082X_2 + 7.595X_2^2 - 2.417X_1X_2 \quad (4)$$

The significance of each coefficient in the equations was determined by Student t-test and p-values. *Coefficients in bold* are statistically significant at the 95 percent confidence level ( $p < 0.05$ ). Positive coefficients represent effects that favor the investigated response variable, while negative coefficients represent antagonistic effects. In the proposed models for the surface tension ( $\hat{Y}_1$ ) and pH ( $\hat{Y}_2$ ), it could be seen that potassium phosphate monobasic ( $X_2$ ) exerts a more significant effect than ammonium sulfate ( $X_1$ ). However, recent studies have demonstrated that nitrogen exerts a more powerful effect than phosphorus in the biodegradation of petroleum hydrocarbons (Huang et al, 2008; Vieira et al, 2009; Zahed et al.; 2010). By other side, the interaction between the phosphorus and nitrogen sources also exert a significant inhibitory effect, in the model proposed for the salinity ( $\hat{Y}_3$ ). Possible reasons for this effect include direct inhibition of metabolic activity because of unfavorable high osmotic potential of the microbe's environment (Amatya et al., 2002), and altered solubility or sorption of toxic or essential ions (Ulrich et al., 2009).

The analysis of variance (ANOVA) of the two first models and of the third model show that they are significant at the 95% ( $p$  less than 0.05) and 90% ( $p$  greater than 0.10) confidence level, respectively, as is evident from the results presented in Table 3. The model F-values and the small "model  $p$  values" (less than 0.05 to models  $\hat{Y}_1$  and  $\hat{Y}_2$  and

less than 0.10 to model  $\hat{Y}_3$ ) indicate that the three first models are statistically significant (adequate) at the 95% (models  $\hat{Y}_1$  and  $\hat{Y}_2$ ) and 90% level confidence (model  $\hat{Y}_3$ ). The lack of fit F-values of models  $\hat{Y}_1$ ,  $\hat{Y}_2$  and  $\hat{Y}_3$  and the large “lack of fit  $p$  values” (greater than 0.05 to models 1 and 2 and greater than 0.10 to model  $\hat{Y}_3$ ) suggest that the quadratic models adequately represent the data and that the lacks of fits are not significant relative to the pure error. To test the goodness of fit of the quadratic polynomial models, the determination coefficients ( $R^2$ ) were evaluated. The closer the value of  $R^2$  is to 1, the better is the correlation between the observed and predicted values. The  $R^2$  value indicates the percent of the variability (VE) in the response that could be explained by the second-order polynomial prediction equation. The value of the adjusted determination coefficient ( $R_{adj}^2$ ) also indicates the significance of the model. The excellent (higher than 0.90 and 0.98 to models  $\hat{Y}_1$  and  $\hat{Y}_2$ ) or good (higher than 0.79 to model  $\hat{Y}_3$ )  $R^2$  values are in reasonable agreement with the adjusted determination coefficient  $R_{adj}^2$ . The adequate precision statistic measure the signal-to-noise ratio, comparing the range of the predicted values at the design points to the average prediction error. A ratio greater than 4 is desirable. The low values of the coefficients of variation (CV) obtained by the models indicates a small residual variability data and the greater reliability of the experiments performed.

The relations among independent variables and response variables can be understood by examining surface plot (Fig. 2). Among the proposed models, only the total massic concentration model (model  $\hat{Y}_4$ ) can not be considered as a quadratic function of ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations. A possible

explanation for this result can be the high nonlinearity of the model in the space investigated (Fig. 2d) and the consequent inadequacy of the second order model proposed.

Empirical model building in the standard RSM approach often entails fitting quadratic polynomials to data derived from statistically designed experiments. In some cases the ability of the quadratic polynomial to approximate the true response surface of a process may not be adequate. Sometimes, in order to build a good response surface model, higher order polynomials or other models such as neural networks are required (Nagata e Chu, 2003). In present work, the second order model to approximate the total massic concentration response surface was discarded (Fig. 2d), in order to avoid arriving at suboptimal conditions. However, neural network based models for this response variable are already being developed and will be published in a future work.

### 3.2 Model Validation and Optimum Conditions

Validation experiments were carried out to verify the accuracy of the models, and the results showed that the predicted values are according to the experimental results. The minimum values for the surface tension and pH and the maximum value for the salinity and the corresponding optimized compositions of biodegradation media (ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations) predicted from the models are presented in Table 4. Experiments were performed to verify the predicted optimum conditions. The optimal ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations obtained by

the three different models investigated were very similar to each other. The surface tension, pH and salinity values obtained from experiments were very close to the actual responses predicted by the regression models, which proved the validities of the models. According to the results obtained, the errors between the calculated values and the experimental values were less than 6%. It is concluded from the table 4 that the kerosene biodegradation (reduction of surface tension and pH and increase of salinity and total massic concentration) is favored at low ammonium sulfate concentration and high concentration of potassium phosphate monobasic.

### 3.3. Kerosene Biodegradation Control in the Optimized Conditions

#### *Control assays of kerosene biodegradation in seawater in optimized conditions*

For the assay with 360 h of kerosene biodegradation carried out in optimized conditions (AMQ-PC) - consisting of sea water, kerosene, additional nutrient salts and inoculum (Fig. 3b) - were performed the following control assays: AMQ-CESS- abiotic control without additional nutrient salts consisting of sea water and kerosene (Fig.3a), AMQ-CECS- abiotic control consisting of sea water, kerosene and additional nutrient salts (Fig. 3c), ADQ-CESS - biotic control without additional nutrient salts consisting of distilled water and kerosene (Fig. 3d), ADQ-PC- biotic control consisting of distilled water, kerosene, additional nutrient salts and inoculum (Fig. 3e) and ADQ-CECS- sterile control consisting of distilled water, kerosene and additional nutrient salts (Fig. 4f). The controls without salts served as a point of reference for reproducible biodegradation under sub-



optimal (nutrient limitation) conditions. The sterile control served to measure abiotic losses (i.e. losses through volatilization and additional dissolution). Controls using distilled water in place of sea water have also been made to monitor and control the salt effect on biodegradation of kerosene.

The effect of the presence of kerosene degrader microorganism and the nutrients salts are visible. In the abiotic experiments carried out with distilled water no emulsion formation occurred. Nutrient salts in low concentrations favor and high concentration disfavor the emulsion formation between kerosene and seawater. Adequated concentrations of initial inoculum and nutrient salts favored the emulsion formation and the utilization of kerosene by *C.lipolytica* UCP 0988. Therefore, the control experiments carried out in the optimized conditions, utilizing kerosene as sole carbon, suggested that the *C.lipolytica* UCP 0988 is capable of degrade kerosene and produce biosurfactant in seawater hypersaline and extremely alkaline.

#### 3.4 Kinetics profile of different expressions of kerosene biodegradation in optimized conditions

The kinetic profiles of the surface tension, pH, salinity and biomass concentration for the experiment carried out with experiment in optimized conditions (AMQ-PC) and in conditions of sterile control experiment consisting of sea water, kerosene and additional nutrient salts (AMQ-CECS) are illustrated in Fig.4. The results in Fig 4a suggests that, initially, the biosurfactant is produced as primary metabolite - with surface tension and pH

reductions- accompanying cellular biomass formation (growth-associated kinetics) and indirectly the kerosene degradation in sea water by *C.lipolytica* UCP 0988. According to Rigas et al. (2005), the decrease of pH is a biological characteristic of fungi as an effort to enhance low pH favored catalytic oxidation of substrates and as a reaction to environmental stress caused by the presence of toxic compounds. The increase in surface tension and pH, after 96h, indicate inhibition of the biosurfactant production, probably due to the production of secondary metabolites.

The yeast could tolerate higher levels of salinity under conditions of high alkalinity and high kerosene contents during 360 h. The results obtained suggest that the level of salinity that can be tolerated by *C.lipolytica* UCP 0988 in the seawater will depend not only on the initial concentration and distribution of salinity in the seawater but will depend on the concentrations and distributions of inoculum, kerosene and hydrogen ions (pH) in the seawater.

The comparison of Fig 4a and 4b allows the observation of the differences between the behavior of the microbial and chemical mass produced during the kerosene biodegradation in seawater hypersaline and extremely alkaline. The results of the purification and identification of the chemical products formed during the kerosene biodegradation in seawater extremely alkaline and hypersaline will be published in future work.

## **Conclusion**

The yeast *C. lipolytica* UCP 0988 was able to grow in seawater using kerosene as the only carbon source and produce BE/BS under effect of various salt-alkaline mixed stress

conditions. Response Surface Methodology showed to be a useful approach for simultaneous modeling and optimization of surface tension, pH and salinity in kerosene biodegradation process in seawater. The haloalkalitolerant yeast *C.lipolytica* UCP 0988 and its BE/BS could be useful to theoretical and empirical researches about multiple tolerance mechanisms and to bioremediation of petroleum and derivatives in hypersaline and extremely seawater.

### **Acknowledgements**

To the Foundation for Science and Technology of the state of Pernambuco (FACEPE) for financial support (PBPG nº 1143-3.06/11) and the Catholic University Pernambuco for the use of the facilities of the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB).

### **References**

- Agarry, S.E., Owabor, C.N., Yusuf, R.O., 2010. Studies on Biodegradation of Kerosene in Soil under Different Bioremediation Strategies. *Bioremediat J.* 14, 135-141.
- Akpoveta, O.V., Egharevb, A.F., Medjor, O.W., 2011. A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. *Int J Environ Sciences.* 2, 54-67.

Albuquerque, C.D.C, Fileti, A.M.F., Campos-Takaki, G.M., 2006. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol.* 6, 575-583.

Amatya, P.L., Hettiaratchi, J.P.A., Joshi, R.C., 2002. Biotreatment of flare pit waste. *J Can Petrol Technol.* 41, 30–36.

Atlas, R.M, Bartha, R., 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 309-317.

Barth, G., Gaillardin, C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev.* 19, 219-237.

Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour Technol.* 74, 63-67.

Cassimiro Jr., R., 2012. Otimização usando algoritmos genéticos de biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988. Dissertation. Universidade Católica de Pernambuco.105p.

Chrzanowski, L., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2006. The ability of *Candida Maltosa* for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 47-51.

Cirigliano, M. C., Carman, G. M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 48, 747-750.

Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F., Belo, I., 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2, 930-944.

Fontes, G.C., Amaral, P.F.F., Nele, M., Coelho, M.A.Z., 2010. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Biomed. Biotech.* 1-8.

Gouda, M.K., Omar, S.H., Chekroud, Z.A., Eldin, H.M.N., 2007. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. *Chemosphere.* 69, 1807–1814.

Hasan, I.F., 2014. Biodegradation of Kerosene by *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 2, 31- 36.

Habba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379-387.

Henriques, M.L.O.M., Silva, A.M., Jara, A.M.A.T., Antunes, A.A.; Campos-Takaki, G.M., Albuquerque, C.D.C., 2011. Bioemulsifier/biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in acid or alkaline seawater with low oxygenation. In: IV International

Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. 562, 14-16.

Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F.L., Liu, R.L., Li, G., 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. Mar. Pollut. Bull. 56, 1714–1718.

Irwin, R.J., Van Mouwerik, M., Stevens, L., Seese, M.D., Basham, W., 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia. Kerosene Entry. National Park Service. Water Resources Division, Water Operating Branch. Oakridge Drive, Suite Fort Collins. 80525.

Kim, J.T., Kang, S.G., Woo, J.H., Lee, J.H., Jeong, B.C., Kim, S.J., 2007. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. Appl Microbiol Biotechnol.74, 820-828.

Kiran, G.S., Thomas, T.A., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. Bioresour Technol. 101, 2389–2396.

Kumar, A., Bisht, B.S, Joshi, V.D, Dhewa, T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. Int J environ sciences. 1, 1079-1093.

Mohajeri, L., Aziz, H.A., Isa, M.H., Zahed, M.A., 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresour. Technol.* 101, 893–900.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, third ed. John Wiley & Sons Inc., New York.

Nagata, Y., Chu, K.H., 2003. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. *Biotechnol Lett.* 25, 1837–1842.

Parra, J.L., 1990. Studies of biosurfactants obtained from olive oil. *Tenside Surfact.* 27, 302.

Rigas, F.; Dritsa, V.; Marchant, R.; Papadopoulou, K.; Avramides, E.J.; Hatzianestis, I. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design *Environmental International*, 31: 191-195, 2005.

Saratale, G., Kalme, S., Bhosale, S., Govindwar, S., 2007. Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM- 1146. *J. Basic Microbiol.* 47, 400–405.

Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A., 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol Adv.* 28, 436–450.

Shabir, G., Afzal, M., Anwar, F., Tahseen, R., Khalid, Z.M., 2008. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *Int. Biodeterior Biodegradation*. 61, 161–166.

Silva, J.F, Campos-Takaki, G.M., Albuquerque, C.D.C., 2011. Kerosene biodegradation and biosurfactant production in seawater by the haloalkalitolerant yeast *Candida lipolytica* UCP 0988. In: IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. 562, 14-16.

Singh, P., Cameotra, S., 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences, *Trends Biotechnol.* 22, 142–146.

Souza, F. A. S. D., Salgueiro, A. A., Albuquerque, C. D. C., 2012. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. *Braz. J. Chem. Eng.* 29, 61 - 67.

Vieira, P.A., Faria, S., Vieira, R.B., De França, F.P., Cardoso, V.L., 2009. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 427–438.



Ulrich, A.C., Guigard, S.E, Julia M. Foght, J.M., Semple, K.M., Pooley, K., Armstrong, J.E., Biggar, K.W., 2009. Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. *Biodeg.*, 20:27–38.

Umanu, G., Babade, M. F., 2013. Biological degradation of kerosene in soil amended with poultry droppings. *I.J.A.B.R.* 3, 254-259.

Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., Okuyama, H., 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr Microbiol.* 49, 415–422 .

Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., Mohajeri, L., Mohjeri, S., 2010. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. *Bioresour. Technol.* 101, 9455-9060.

Zinjarde, S., Kale, B.V., Vishwasrao, P.V., Kumar, A.R., 2008. Morphogenetic behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. *J Microbiol Biotechnol.* 18, 1522–1528.

**Table 1** Levels and experimental ranges of the independent variables of the central composite design

Independent Variable	Level				
	-1.41	-1	0	1	1.41
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	1.554	1.8	2.4	3.0	3.246
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	23.995	24.2	24.7	25.2	25.405

**Table 2** Central composite design matrix of independent variables with corresponding experimental results for response variables with 360 h of biodegradation

Run	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	pH	ΔpH (%)	Sal (‰)	ΔSal (%)	MC (g/L)	TS (mN/m)	ΔST (%)	EAM (UEA)	EAH (UEA)
1	1.8	24.2	12.88	-2.20	95.00	1.06	37.70	39.50	-2.95	5.82	1.23
2	3.0	24.2	12.76	-2.00	90.00	0.00	33.32	41.20	-1.20	4.76	4.93
3	1.8	25.2	12.85	-1.91	95.00	5.56	47.50	39.40	-2.48	0.69	2.05
4	3.0	25.2	12.48	-1.73	95.00	2.15	42.30	38.20	-4.98	6.00	5.36
5	1.554	24.7	12.9	-2.20	95.00	1.06	40.78	37.60	-0.27	5.35	3.08
6	3.246	24.7	12.53	-2.87	95.00	0.00	53.62	38.20	-1.29	4.93	4.99
7	2.4	23.995	12.86	-2.13	93.00	-2.11	46.36	40.90	12.67	6.00	1.96
8	2.4	25.405	12.61	-3.07	95.00	0.00	51.20	38.30	-13.93	6.00	3.30
9	2.4	24.7	12.56	-0.87	95.00	4.40	45.04	35.30	0.28	4.89	2.30
10	2.4	24.7	12.55	-3.39	96.00	2.13	49.44	36.30	-9.93	4.89	1.00
11	2.4	24.7	12.63	-2.85	95.00	3.26	42.96	37.10	-5.36	5.18	3.19
MCP	2.4	24.7	12.58	-2.37	95.33	3.26	45.81	36.23	-4.99	4.99	2.88
SDCP	0.0	0.0	0.04	1.33	0.58	1.13	3.31	0.90	5.11	0.17	1.93

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ammonium Sulfate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- Potassium Phosphate Monobasic pH - Hydrogenionic Potential Δ- change in Sal – Salinity TS - Surface Tension MC - Massic Concentration EAC, EAH e EAK - Emulsification Activities for water-in-corn oil, water-in-n-hexadecane and water-in-kerosene MCP-Mean of Center point SDCP-Standard Deviation of Center Point

**Table 3** - ANOVA results for the two factor composite central design

Response	F <sub>mod</sub>	F <sub>LOF</sub>	p <sub>AM</sub>	p <sub>LOF</sub>	F <sub>mod</sub> /F <sub>tab</sub>	F <sub>LOF</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub>	VE	CV
$\hat{Y}_1$	9.95	0.56	0.0123824	0.6922496	1.97	19.16	0.9087	0.8173	0.9562	0.0058
$\hat{Y}_2$	52.86	0.17	0.0002502	0.9106616	10.47	0.01	0.9814	0.9629	0.9962	0.0016
$\hat{Y}_3$	3.89	4.80	0.0812558	0.1771603	0.77	0.25	0.7954	0.5908	0.8157	0.0020
$\hat{Y}_4$	0.39	7.15	0.836246	0.1251381	0.08	0.37	0.2818	0.000	0.3001	0.0092

$\hat{Y}_1$ -Surface Tension  $\hat{Y}_2$ -pH  $\hat{Y}_3$ -Salinity  $\hat{Y}_4$ -Massic Concentration F<sub>mod</sub>- Model F value F<sub>LOF</sub>- Lack of Fit F Value F<sub>LOF</sub>/F<sub>tab</sub>-Ratio  
R<sup>2</sup> -Determination Coefficient R<sup>2</sup><sub>adj.</sub>-Adjusted Determination Coefficient VE-Variability Explained CV-Coefficeint of variation

**Table 4** - Critical (maximum or minimum) response variables values identified by quadratic polynomial models and the corresponding optima of the ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations.

Response Variable	Predicted Optimal Values	Experimental Optimal Values	Error (%)	Predicted Optimal Composition	
				$X_1$ : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	$X_2$ : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)
$\hat{Y}_1$ : Surface Tension (mN/m)	36.13536	35.36±0.37	2.19	2.39791	24.81136
$\hat{Y}_2$ : pH	12.45478	13.24±0.93	5.93	3.18901	25.20270
$\hat{Y}_3$ : Salinity (‰)	95.59697	97.67±3.29	2.12	2.13647	24.82548

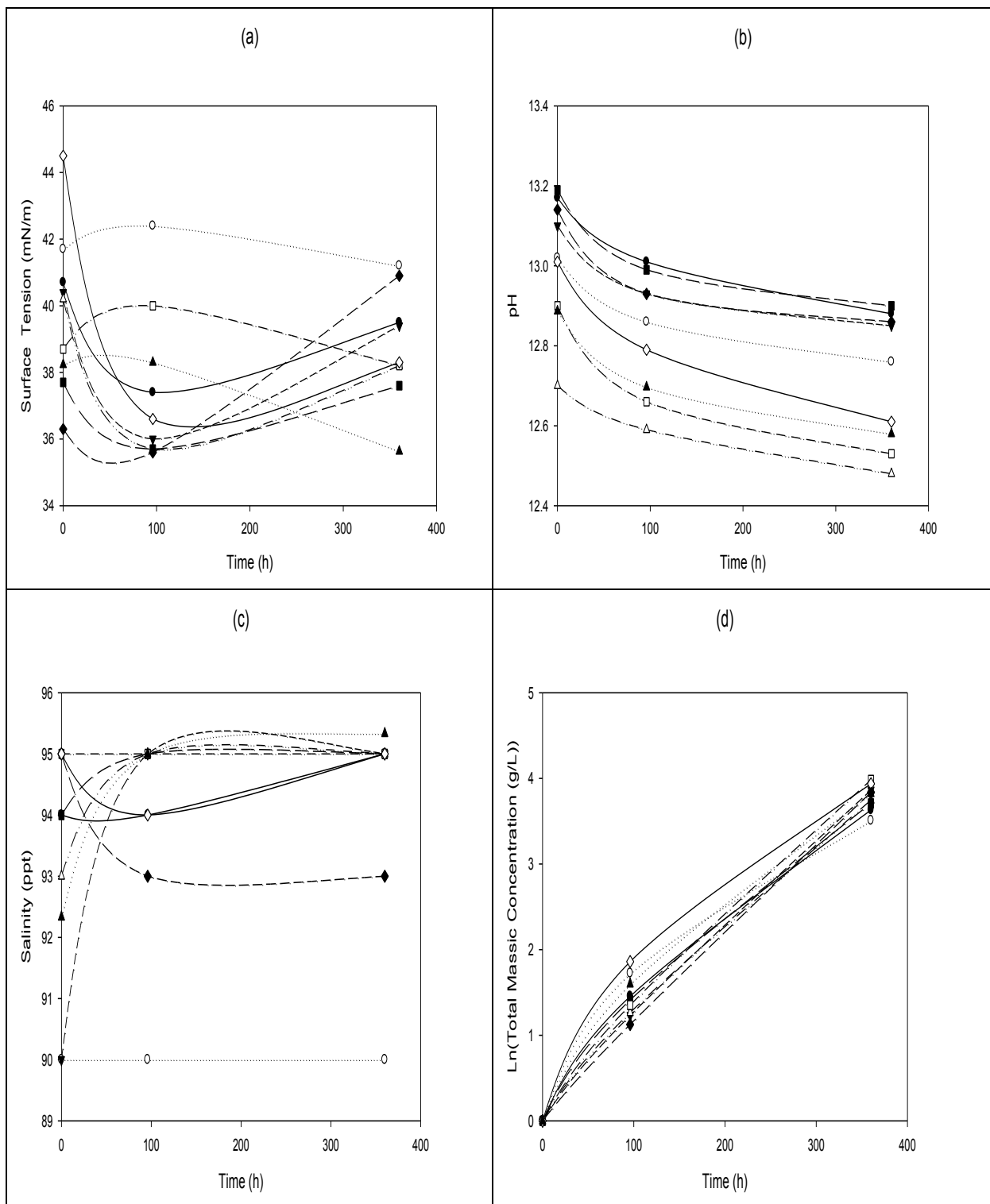
### Caption Figures

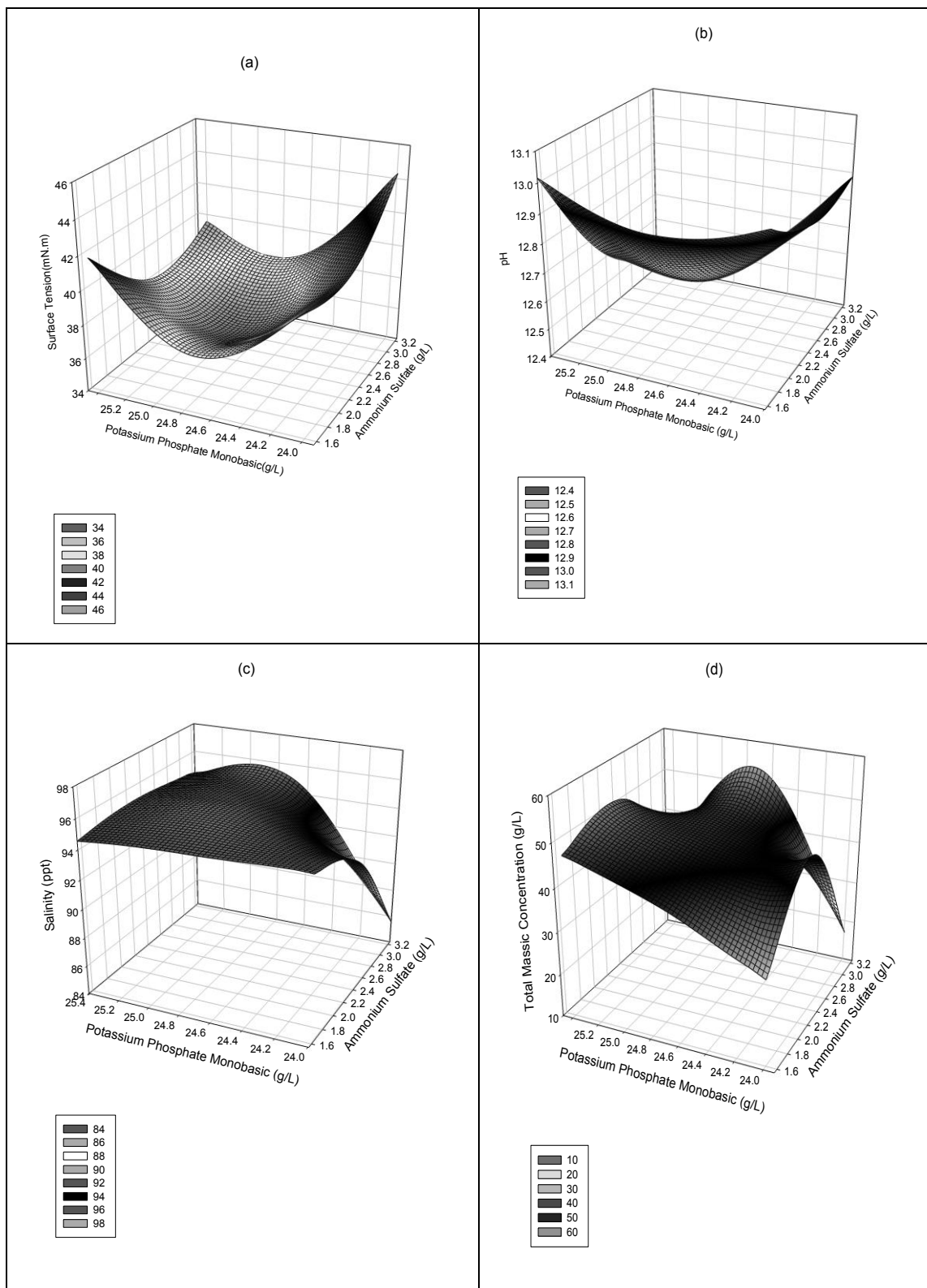
**Fig.1.** Time course profiles of the surface tension, pH, salinity and total massic concentration for the 8 runs (● Run 1, ○ Run 2, ▼ Run 3, △ Run 4, ■ Run 5, □ Run 6, ◆ Run 7 and ◇ Run 8) and the mean of the triplicate of the center point (▲ Mean of the runs 9, 10 e 11) of the CCD.

**Fig.2.** Response surfaces plots showing - with 360 h- the effects of the ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic concentrations on : (a) Surface tension, (b) pH, (c) Salinity and (d) Total Massic Concentration.

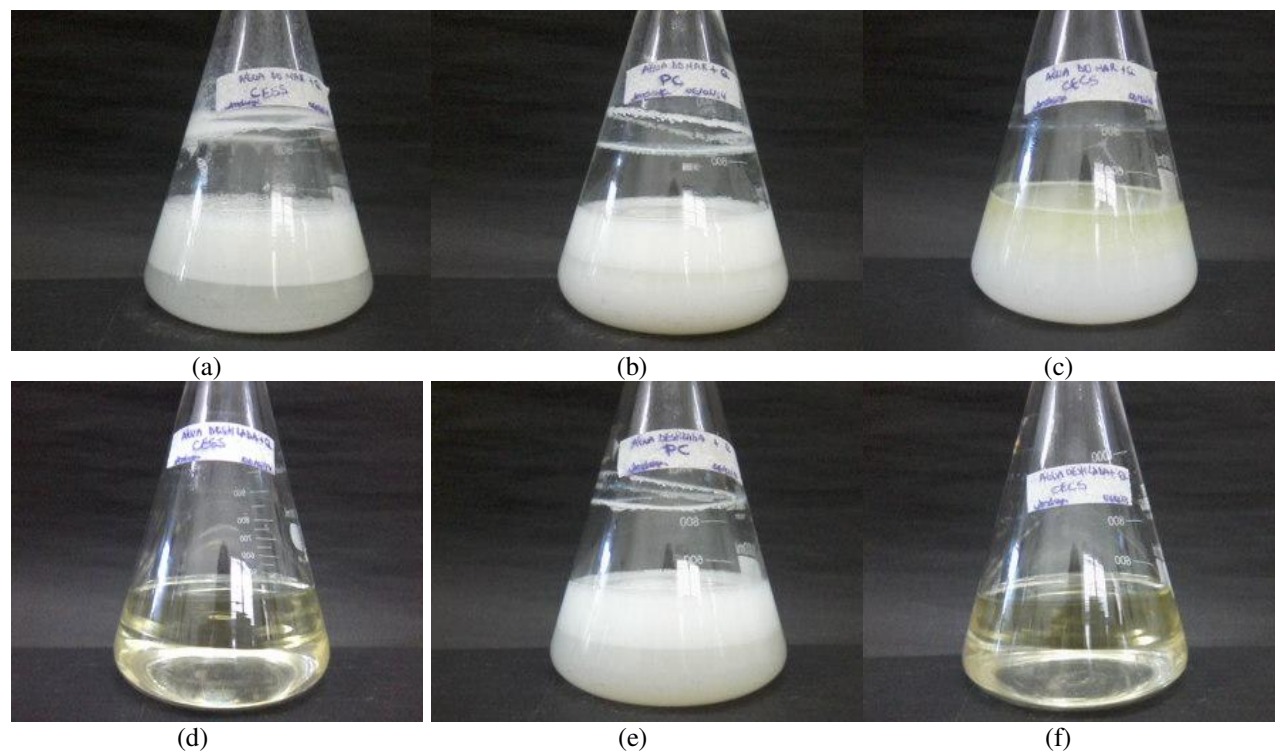
**Fig.3.** Kerosene Biodegradation in sea water with 360 h: AMQ-CESS- abiotic control, without additional nutrient salts, consisting of sea water and kerosene (Fig.3b), (b) AMQ-PC- biotic assay carried out in optimized conditions, consisting of inoculum, sea water, kerosene and additional nutrient salts, (c) AMQ-CECS- abiotic control consisting of sea water, kerosene and additional nutrient salts, (d) ADQ-CESS- abiotic control, without additional nutrient salts, consisting of distilled water and kerosene (e) ADQ-PC- biotic control, consisting of inoculum, distilled water, kerosene and additional nutrient salts and (f) ADQ-CECS - abiotic control consisting of distilled water, kerosene and additional nutrient salts.

**Fig.4.** Kinetic profiles of assay in optimized conditions and sterile control: (a) Time course profiles of the surface tension (△), pH (◇), salinity (□) and total massic concentration (○) for the experiment carried out in optimized conditions (AMQ-PC), (b) Time course profiles of the surface tension (△), pH (◇), salinity (□) and total massic concentration(○) for the sterile control consisting of sea water, kerosene and additional nutrient salts (AMQ-CECS).

**Fig. 1.**

**Fig. 2.**





**Fig. 3.**

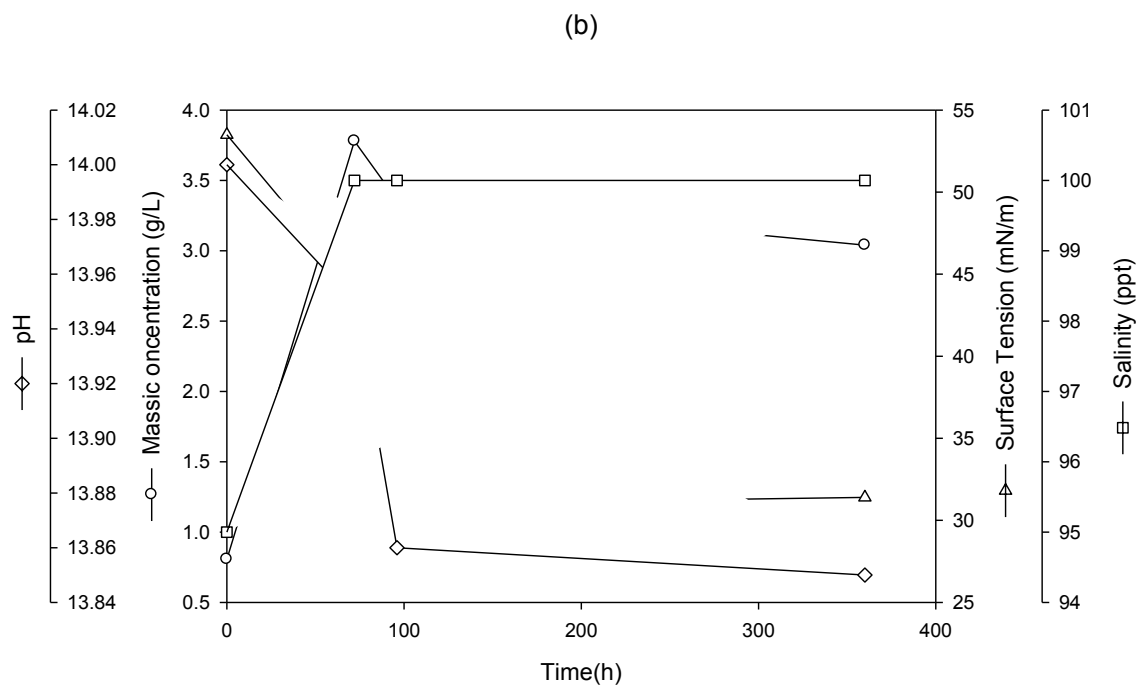
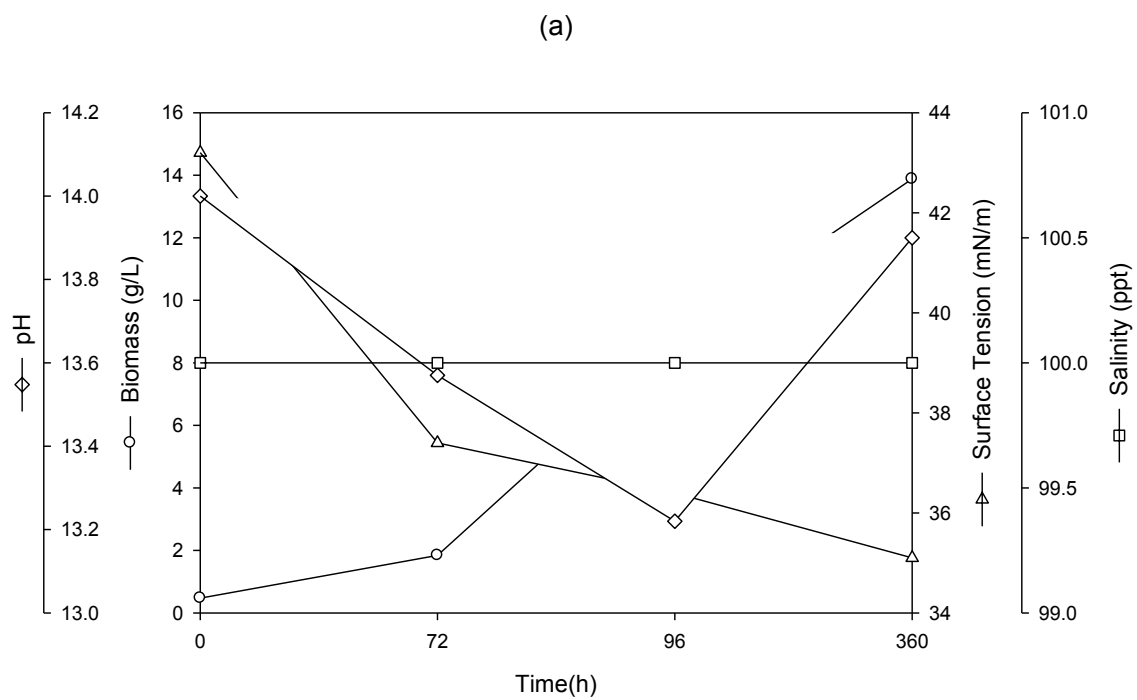


Fig. 4