



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

Lilianne Gonçalves Lima

**DIMORFISMO, QUIMIOTROPISMO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE
ÓLEO DIESEL POR *Candida lipolytica* UCP 0988 EM
ÁGUA DO MAR**

Recife

2018

Lilianne Gonçalves Lima

**DIMORFISMO, QUIMIOTROPISMO E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE
ÓLEO DIESEL POR *Candida lipolytica* UCP 0988 EM
ÁGUA DO MAR**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente/
Informática, Modelagem e Controle de Processo

Orientadora: Prof. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

Recife

2018

Lima, Lilianne Gonçalves

Dimorfismo, Quimiotropismo e Formação de Biofilme em Processo de Biodegradação de Óleo Diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em Água do Mar./Lilianne Gonçalves Lima; orientadora Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, 2018.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco.

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Biodegradação de Hidrocarbonetos. 2. Biofilme de Levedura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura. 4. Cromatografia Gasosa. 5. Biorremediação Marinha. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

DIMORFISMO, QUIMIOTROPISMO E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL E NYLON POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988 EM ÁGUA DO MAR

Lilianne Gonçalves Lima

Examinadores:

Prof^a. Dr^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque - Orientadora
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof.Dr. Carlos Alberto da Silva – Titular Interno
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão – Titular Externo
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Ao amigo Joabe Gomes, ao meu maior
incentivo Danilo Souza e ao meu parceiro
Gilvan Marinho.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, pelos ensinamentos, paciência, atenção e compreensão durante o convívio e pela participação efetiva e imprescindível no desenvolvimento e concretização desta pesquisa;

À Coordenadora do curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – MDPA e Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP; Prof^a Dr^a Galba Maria Campos Takaki pela paciência e aconselhamento e por disponibilizar as instalações, equipamento e reagentes;

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP; Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Marcos Antônio Cavalcanti Luna, Thayse Alves de Lima e Silva, Davi de Lima Cavalcanti e Grayce Kelli Barbosa da Silva.

Aos funcionários Sr. Humberto e André Felipe pela colaboração;

Ao Professor Marcos Antonio Barbosa de Lima pela colaboração na realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV);

À Profa. Norma Buarque de Gusmão da Universidade Federal de Pernambuco por disponibilizar o uso do Laboratório de Cromatografia e a Pécio Alexandre da Silva pela colaboração na realização da cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa;

Ao Amigo Joabe Gomes de Melo sem o qual a continuidade do mestrado não teria sido possível;

Ao Meu Parceiro, Gilvan Marinho, pelo incentivo, compreensão e horas de dedicação;

Aos amigos que compartilharam a caminhada, Jefferson Cunha, Tiago Bento e Cassia Mororó;

Ao IFAL pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
Capítulo 1.....	xi
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 Objetivos.....	4
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	5
1.3.1 A IMPORTÂNCIA DAS ÁGUAS MARÍTIMAS BRASILEIRAS PARA O BRASIL.....	5
1.3.2 PETRÓLEO	6
1.3.3 ÓLEO DIESEL.....	11
1.3.4 POLUIÇÃO AMBIENTAL MARINHA ENVOLVENDO PETRÓLEO E/OU SEUS DERIVADOS.....	13
1.3.5 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO.....	19
1.3.5.1 BIODEGRADAÇÃO.....	20
1.3.6 MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES	22
1.3.6.1 <i>DIMORFISMO EM CANDIDA LIPOLYTICA (YARROWIA LIPOLYTICA)</i>	23
1.3.7 QUIMIOTROPISMO	27
1.3.8 BIOFILMES.....	29
1.3.9 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASSA	34
1.3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	35
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
Capítulo 2.....	54
Capítulo 3.....	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Esquema do processo de produção de óleo.	9
Figura 2. Esquema simplificado da destilação do petróleo.	11
Figura 3. Consumo de energia, no setor de transportes, no ano de 2015.	12
Figura 4. Esquema simplificado da ação de micro-organismo sobre um contaminante	21
Figura 5. Microscopia eletrônica da <i>Candida lipolytica</i> (A) blastosporos, (H) hifas.	24
Figura 6. Dinâmica geral de formação e maturação de biofilme monoespécie	333

CAPÍTULO II

Figura 1. Perfis de (a) crescimento microbiano, salinidade e gravidade específica e (b) pH e atividades de emulsificação água em emulsão água-em-óleo de milho (AEM) e água-em-óleo diesel (AED) de <i>C.lipolytica</i> UCP 0988 em processo de biodegradação de óleo diesel 10% em água do mar	65
Figura 2. Fotomicrografias eletrônicas de varredura representativas de transição de hifa para micélio de <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar contaminada com 20%(v/v) de óleo diesel B7, pH 3, incubada a 28° C. (a - b) com 24 h e (c-d) com 21 dias.....	68
Figura 3. Quimiotropismo e diferentes estágios de formação de biofilme sobre superfícies de vidro e de aço inoxidável de biorreator em processo de biodegradação de óleo diesel B7 por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar: (a) 24 h (b) 3 dias (c) 8 dias (d) 17 dias (e) 25 dias e (f) 49 dias.....	70
Figura 4. Eletromicrografia de varredura de estrutura tridimensional de biofilme formado sobre superfície de vidro de biorreator durante processo de biodegradação de óleo diesel por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar e de células planctônicas com	

21 dias de líquido metabólico inoculado com biofilme destacado das superfícies de vidro.....75

Figura 5. Biodegradação de óleo diesel 10% em água do mar por *C.lipolytica* UCP 0988 em biorreator: fotografias (a, d, g ,m), eletronicografias de varredura (b, e, h-i-j, n-o-p) e cromatogramas (c, f, l, q).....78

Figura 6. Percentuais de remoção de hidrocarbonetos de óleo diesel B7 (7% biodiesel 93% petrodiesel) por *C.lipolytica* UCP 0988 em água do mar, após (a) 24 h, (b) 49 dias e (c) 69 dias.....81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Hidrocarbonetos e Compostos Heterogêneos do Petróleo.....	8
Tabela 2. Principais derivados de petróleo e suas respectivas aplicações.....	10
Tabela 3. Efeitos da ação de derramamento de petróleo em comunidades biológicas	16
Tabela 4. Fatores que influenciam a formação e o desenvolvimento de biofilmes	322

CAPÍTULO II

Tabela 1. Relações entre Heptano, pristano, octadecano e fitano durante processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar por <i>C.lipolytica</i> UCP 0988 melhorado por biofilme da levedura.....	83
--	----

RESUMO

Neste estudo foi investigado e demonstrado pela primeira vez a habilidade de *Candida lipolytica* UCP 0988 crescer sem aclimatação prévia, em água do mar natural contaminada com óleo diesel B7 e degradar hidrocarbonetos alifáticos e ácidos graxos do biodiesel, com o apoio dos fenômenos de quimiotropismo, dimorfismo e formação de biofilme nas superfícies de vidro e aço inoxidável de biorreator do tipo batelada de tanque agitado, usado como modelo físico para simulação em escala de laboratório de biorremediação *ex-situ* de água do mar poluída com hidrocarbonetos. Registros fotográficos, inspeção visual, microscopia ótica e eletrônica de varredura foram usadas para monitorar os fenômenos de quimiotropismo, dimorfismo e formação de biofilme. Cromatografia gasosa usando detector de ionização de chama associada a espectrometria de massa foi usada para identificar e determinar os percentuais de biodegradação global e individual de 13 alcanos de cadeia aberta, 1 alcano de cadeia ramificada, 2 alcanos isopropenóides do petro diesel e 3 esterres metílicos do biodiesel. Percentuais de remoção global iguais a 47,95%, 94,63% e 97,72% foram obtidos respectivamente com 1, 49 e 69 dias. O modelo de sistema de biorremediação *ex-situ* proposto, apresenta potencial para aplicação em biorremediação de água do mar contaminada com hidrocarbonetos de petróleo.

Palavras-chave: Biodegradação de Hidrocarbonetos, Petróleo, Biodiesel; Microscopia Eletrônica de Varredura; Cromatografia Gasosa; Biorremediação marinha.

ABSTRACT

In this study, it was investigated and demonstrated for the first time the ability of *C.lipolytica* UCP 0988 to grow without previous acclimatization in natural sea water contaminated with B7 diesel oil and to degrade aliphatic hydrocarbons and fatty acids of biodiesel, with the support of the phenomena of quimiotropism, dimorphism and biofilm formation on glass and stainless steel surfaces of agitated tank batch reactor, used as a physical model for *ex-situ* bioremediation laboratory simulation of hydrocarbon polluted sea water. Photographic records, visual inspection, optical microscopy and scanning electronics were used to monitor the phenomena of chemotropism, dimorphism and biofilm formation. Gas chromatography using flame ionization detector associated with mass spectrometry was used to identify and determine percentages of individual and overall biodegradation of 13 open chain alkanes, 1 branched chain alkane, 2 petrodiesel isopropenoid alkanes and 3 methyl esters of the biodiesel. Percentages of total removal equal to 47.95%, 94.63% and 97.72% were obtained respectively at 1, 49 and 69 days. The proposed *ex-situ* bioremediation system model presents potential for application in bioremediation of seawater contaminated with petroleum hydrocarbons.

Keywords: Hydrocarbon Biodegradation; Petroleum; Biodiesel; Scanning Eletronic Microscopy; Gas Cromatography; Marine Biorremediation.

Capítulo 1

1.1 INTRODUÇÃO

A extração de óleo em plataformas, produção, armazenamento, lavagem dos tanques de navios petroleiros e transporte de petróleo e seus derivados, em navios e oleodutos, já protagonizaram diversos acidentes ambientais (CETESB, 2016). Especialistas afirmam que os acidentes deixam sequelas que se estendem por 20 anos ou mais, e que a recuperação da área afetada é sempre muito difícil, mesmo com a intervenção humana (BISPO et al., 2012).

A biodegradação é um processo natural, que pode ocorrer sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, no qual agentes biológicos podem degradar substâncias indesejáveis (CERQUEIRA; COSTA, 2009). Durante esse processo compostos orgânicos podem ser transformados em estruturas com cadeias menores (biotransformação), e serem reduzidos a estruturas inorgânicas, tais como água, amônia e dióxido de carbono (mineralização) ou ainda metabolizados simultaneamente a um outro composto (co-metabolismo) (DALTON et al., 1982, *apud* MELLO, 2007). Para derivados de petróleo a biodegradação ocorre quando micro-organismos (bactérias e fungos) utilizam os hidrocarbonetos presentes na composição do material contaminante como fonte de alimentação. Nesse processo ocorre a conversão de macromoléculas em compostos de baixa massa molecular. A princípio estes poluentes são transformados em subprodutos oxidados que, posteriormente, serão degradados em gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) (ZHANG et al., 2005; HEIDERSCHEIDT, 2016).

A versatilidade anabólica e catabólica, a abundância e diversidade de espécies e principalmente a capacidade de adaptação às condições adversas do meio fazem dos micro-organismos, biodegradadores extremamente eficientes, e por isso muitos estudos têm sido desenvolvidos relacionando estes seres a biodegradação de petróleo e seus derivados (LIU et al., 2011; KUMARI; ABRAHAM, 2011; DHAR; DUTTA; ANWAR, 2012; SOUZA; SALGUEIRO; ALBUQUERQUE, 2012; PINHATI et al., 2014; GONÇALVES; CERQUEIRA; QUINTELLA, 2014; ARAÚJO et al., 2014).

No que se refere ao uso potencial da espécie *Candida lipolytica*, há trabalhos que descrevem a aplicação deste micro-organismo em sistemas alimentares (ZINJARDE, 2014), degradação de óleo diesel (KARIGAR; RAO, 2011;

HASSANSHAHIAN et al., 2012), controle de derramamentos (MAHMOUD et al., 2015), tratamento de águas residuais (YANG et al., 2012), produção de agentes surfactantes (BRASILEIRO et al., 2014), de lipases (GOMES; TEIXEIRA; BELO, 2010), de ácidos orgânicos (COELHO; AMARAL; BELO, 2010), de lipídeos microbianos – Single-cell-oil e de aromas (THEVENIEAU; NICAUD; GAILLARDIN, 2009).

Biofilmes consistem em populações de uma única ou de múltiplas espécies microbianas, com habilidade de se desenvolverem aderidas a superfícies bióticas e/ou abióticas (forma séssil), ou suspensas em soluções (forma planctônica) originando ecossistemas coordenados (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001, *apud* TELLES, 2011; TAN et al. 2014). Os micro-organismos presentes no biofilme são capazes não apenas de degradar compostos orgânicos específicos, mas também a matéria orgânica produzida por eles durante a biodegradação (AZIM, 2009; WU et al, 2014). Sob condições de estresse apresentam melhores atividade metabólica, taxa de transferência de genes e sobrevivência quando comparados com as células planctônicas. Por isso, sua aplicação em atividades de biorremediação, embora recente, tem se tornado cada vez maior (KIRCHMAN e MITCHELL, 1982, *apud* ARUTCHELVI et al., 2011). Desse modo, vários estudos têm sido realizados em diferentes corpos hídricos tais como reservatórios (BARBOSA et al., 2012), lagos (BORDUQUI, 2011), lagoas (FERNANDES et al., 2009), estações marinhas (BARBOZA, 2008), açudes e rios (CARAMUJO et al., 2008; TIEN et al., 2011), com o intuito de compreender melhor os mecanismos relacionados a produção e caracterização dos biofilmes.

Neste contexto, procurando contribuir com as pesquisas sobre biorremediação de ambientes marinhos contaminados com petróleo e derivados, no presente trabalho foi implementado em biorreator descontínuo de tanque agitado, um modelo de biorremediação *ex-situ*, em pequena escala, para investigar a biodegradação de óleo diesel em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 e as interconexões dos fenômenos de dimorfismo, quimiotropismo e formação de biofilme com o melhoramento do processo biodegradativo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar as relações entre dimorfismo, quimiotropismo e formação de biofilme em processo de biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* 0988 em água do mar.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Implementar processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C.lipolytica* UCP 0988, em biorreator tipo tanque agitado (BSTR *Batch Stirred Tank Reactor*), operado em batelada;
- Investigar a ocorrência de dimorfismo e de quimiotropismo em células de *C.lipolytica* UCP 0988, durante a biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar;
- Investigar os mecanismos de adesão e de formação de biofilme nas superfícies laterais de vidro e na tampa de aço inoxidável do biorreator;
- Analisar por microscopia eletrônica de varredura, o biofilme formado durante a biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar;
- Analisar os perfis cromatográficos do óleo diesel metropolitano B7 antes, durante e após o processo de biodegradação.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 A IMPORTÂNCIA DAS ÁGUAS MARÍTIMAS BRASILEIRAS PARA O BRASIL

O Brasil é o país com a maior costa atlântica do mundo. Os espaços marítimos brasileiros correspondem a cerca de 3,5 milhões de km². Este número mudará para 4,5 milhões de km² se aceitas as recomendações junto à Comissão de Limites da Plataforma Continental da Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar. Devido ao potencial econômico, biodiversidade, vulnerabilidade e localização estratégica, essa imensa extensão territorial passou a ser denominada pela Marinha do Brasil (MB) de “Amazônia Azul” (AMORIM, 2011).

Totalizando aproximadamente 52% da área continental do país as águas marítimas encerram uma infinidade de organismos, cuja biodiversidade é comparável a da “Amazônia Verde”. Esse rico ecossistema marinho configura uma importante fonte de riqueza alimentar, biológica, energética, mineral e genética para o Brasil. A “Amazônia Azul” constitui o caminho por onde passam aproximadamente 95% de toda produção destinada ao comércio exterior. Relacionado ao tráfego de embarcações náuticas, merecem destaque as atividades transporte de passageiros, o turismo marítimo, os esportes náuticos e a navegação de cabotagem. Milhares de empregos diretos e indiretos estão relacionados às atividades de turismo, transporte e alimentação, e outros milhões estão associados aos setores de pesquisa e de petróleo (HAZIN, 2010).

Cerca de 90% das reservas nacionais de petróleo e gás estão em áreas marítimas e a exploração destes recursos naturais representa uma possibilidade de desenvolvimento social e econômico. De acordo com a PETROBRÁS¹, no ano de 2017, a média anual de barris de petróleo por dia foi de 2,15 milhões. Isto significa uma alta de 0,4% em relação ao ano anterior. Já a extração de gás natural atingiu a marca inédita de 79,6 milhões de metros cúbicos por dia (m³/d), com produção total de 2,65 milhões de barris de óleo equivalente por dia.

¹ Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/fatos-e-dados/planejamento-e-capacidade-tecnica-de-nossas-equipes-levam-a-recorde-de-producao.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

1.3.2 PETRÓLEO

Dentre as muitas teorias existentes para descrever a genealogia do petróleo, atualmente, a mais aceita é a biogênica, que atribui a formação à decomposição e deposição de material orgânico, em bacias sedimentares ao longo de milhares de anos, em condições termoquímicas de altas temperaturas e pressões. Acredita-se que essa mistura de óleo cru e gás natural tenha migrado lentamente no subsolo, há milhões de anos, através de aquíferos até ficar aprisionada em poços de rochas porosas e permeáveis, denominadas rochas reservatório (ou de formação) (THOMAS, 2004; SELLEY, 2012; SPEIGHT, 2014).

Geologicamente, o óleo é produzido durante a catagênese (60°C a 165°C), por meio do craqueamento do querogênio e a formação do gás na metagênese (até 210°C). Estudos indicam que, essa mistura de óleo cru tenha se formado por ação de bactérias anaeróbicas sobre restos de animais e plantas depositados com sedimentos, em altas profundidades, produzindo transformações químicas específicas, dando origem a um produto que migraria até se acumular nas rochas reservatórias – o petróleo. Os detalhes destas reações e seus respectivos mecanismos ainda são incertos, contudo, é de se esperar que polimerizações, isomerizações, hidrogenações e craqueamentos tenham ocorrido ao longo de todo processo. (THOMAS, 2004; SELLEY, 2012; SPEIGHT, 2014).

A palavra petróleo é originária do latim *pretroleum*, que significa pedra (*petrus*) e óleo (*oleum*). É designada para definir um combustível fóssil, que quando em condições ambiente, é inflamável, de consistência oleosa, densidade inferior a 1,0 g.mL⁻¹, cheiro característico e cor variando entre castanho e negro (SZKLO; ULLER; BONFÁ 2012).

A densidade, juntamente com a viscosidade, a distribuição do ponto de ebulição, a salinidade e o grau API (índice adimensional criado pelo *American Petroleum Institute*) são os principais parâmetros utilizados na qualificação do petróleo bruto (BARBOSA et al., 2013). O ° API é utilizado por diversos setores e empresas petrolíferas, e numericamente apresenta uma relação inversamente proporcional a densidade específica. Ou seja, quanto menor a densidade do óleo, maior será o °API,

maior a qualidade e menor o custo de beneficiamento do petróleo, o que aumenta, assim, seu valor de mercado. Quando o °API é superior a 31,1 o petróleo é considerado leve, quando no intervalo de 22,3 a 31,1 é classificado como médio, entre 22,3 e 10 é pesado, e extra pesado quando apresenta °API inferior a 10. (SZKLO; ULLER; BONFÁ 2012). A fórmula para mensurar o grau API é:

$$^{\circ}\text{API} = \frac{141,5}{\text{Densidade Específica}} - 131,5$$

Onde a densidade específica do material é calculada a temperatura ambiente, a 60°F, tomando-se como referência a densidade da água na mesma temperatura (COSTA, 2015).

O petróleo consiste em uma mistura natural e complexa de vários componentes, entretanto, os compostos formados exclusivamente por carbono e hidrogênio são os constituintes preponderantes, e representam cerca de 90% da composição dos óleos crus. Na constituição fundamental estes elementos apresentam porcentagem em massa em intervalos de 82,2 a 87,1% e 11,8 a 14,7%, respectivamente. Estudos realizados pelo American Petroleum Institute concluíram que, substancialmente, todos os tipos de petróleo contêm, em diferentes quantidades, os mesmos hidrocarbonetos. A norma técnica Standard Terminology Relating to Petroleum Products, and Lubricants – D4175 09, a American Society for Testing and Materials – ASTM – define o petróleo como:

“Uma mistura de hidrocarbonetos de ocorrência natural, geralmente em estado líquido, que também pode incluir compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais e outros elementos”.

Contudo, estes não são os únicos elementos presentes. Compostos nitrogenados, oxigenados, sulfurados, sais minerais dissolvidos e derivados metálicos também são encontrados em menor concentração. Assim, enxofre, oxigênio, nitrogênio e outros elementos (As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Mg e Na) também podem fazer parte da constituição, contudo, em percentuais bem inferiores (ANDRADE et al., 2010; FARAH, 2012; SÁNCHEZ; TODOLÍ; LIENEMANN, 2013; SELLEY, 2012; SPEIGHT, 2014).

Entre as diferentes formas de classificação, os hidrocarbonetos presentes no petróleo podem ser divididos em três grupos: parafínicos (saturados, lineares ou pouco ramificados), naftênicos (cicloalcanos) e aromáticos (com núcleo benzênico). E a depender do tipo de petróleo é possível haver em sua constituição moléculas no estado gasoso ($C_1 - C_4$), líquido ($C_5 - C_{17}$) ou sólido (maior ou igual a C_{18}) (WU et al., 2013).

A Tabela 1 apresenta, de maneira simplificada, as principais classes de hidrocarbonetos e compostos heterogêneos que constituem o petróleo.

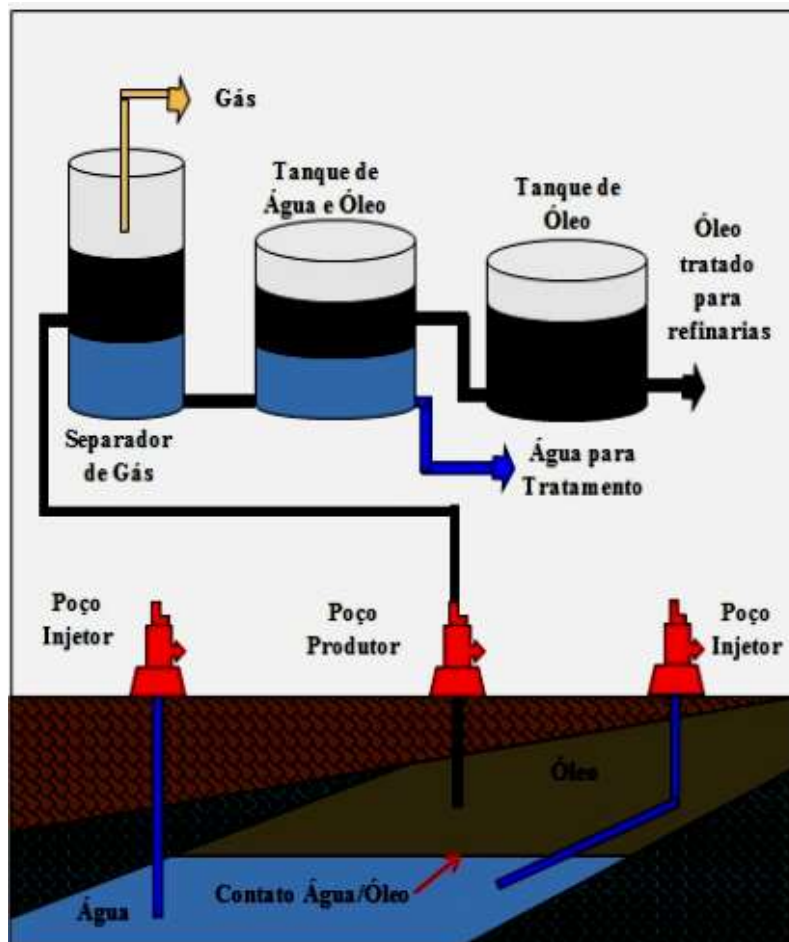
Tabela 1. Hidrocarbonetos e Compostos Heterogêneos do Petróleo

CLASSES	COMPOSTOS TÍPICOS
Hidrocarbonetos Saturados	N-parafinas
	Iso-parafinas e outros parafinas ramificadas
	Cicloparafinas (naftenos)
	Cicloparafinas condensadas
	Alquil de cadeias laterais ou sistemas de anéis
Hidrocarbonetos Insaturados	Olefinas produzidas em reações térmicas
Hidrocarbonetos Aromáticos	Sistemas benzênicos
	Sistemas aromáticos condensados
	Sistemas aromáticos-cicloalquil condensados
	Alquil de cadeias laterais ou sistemas de anéis
Sistemas Heteroatômicos Saturados	Alquilas sulfuradas
	Cicloalquil sulfuradas
	Alquil de cadeias laterais ou sistemas de anéis
Sistemas Heteroatômicos Aromáticos	Furanos
	Tiofenos
	Pirróis
	Piridinas
	Sistemas heteroatômicos misturados
	Sistemas anfóteros (ácido-base)
	Cadeias laterais alquilas em sistemas de anéis

Fonte: SPEIGHT, 2014

O processo de extração do petróleo ocorre de maneira conjunta com a água emulsionada, que em geral, apresenta alta salinidade. Essa mistura constitui um meio extremamente agressivo (SOUZA; 2008). Na representação simplificada da Figura 1, é possível observar as regiões do reservatório onde estão presentes óleo e água, e as colunas de subsuperfície dos poços de produção e injeção.

Figura 1. Esquema do processo de produção de óleo.



Fonte: VIEIRA; 2013.

O refino do petróleo consiste em uma série de etapas que envolvem diversas operações físicas e químicas interligadas entre si. Estas se modificam de acordo com o tipo de óleo, de modo a garantir o aproveitamento máximo do potencial energético por meio da geração dos cortes, ou produtos fracionados derivados, de composição e propriedades físico-químicas determinadas. Por conseguinte, refinar petróleo consiste

em separar suas frações e em seguida processá-las, transformando-as em produtos úteis, tais como, querosene, diesel, gasolina, asfalto, etc.(COSTA, 2015).

Os principais derivados do petróleo e suas respectivas aplicações estão listadas na Tabela 2.

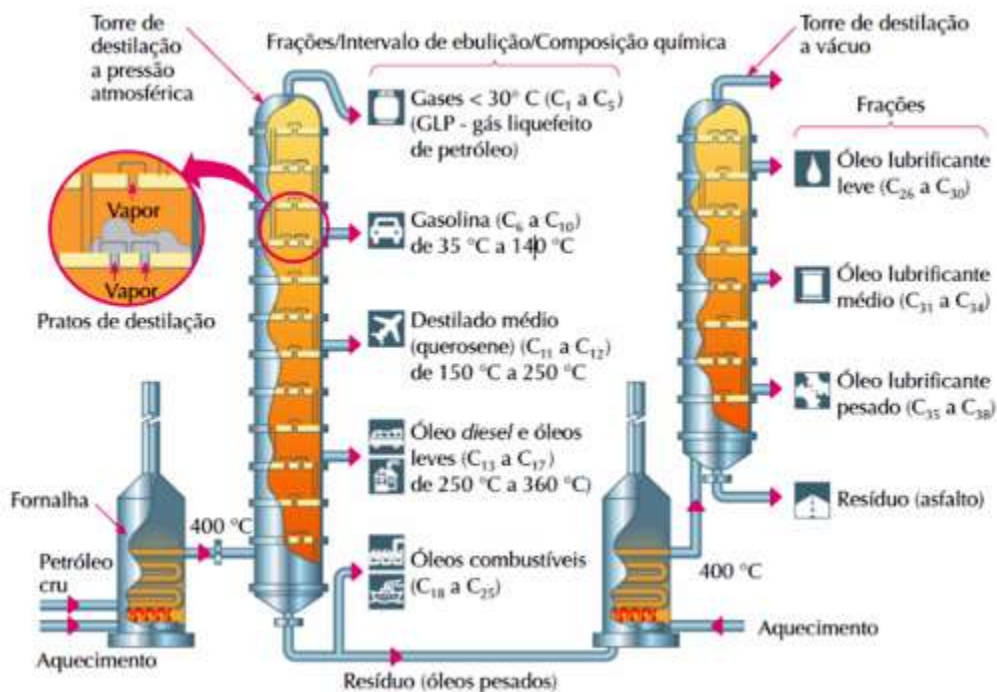
Tabela 2. Principais derivados de petróleo e suas respectivas aplicações

Derivado	Principais Aplicações
Combustível	
Gasolina	Combustível Automotivo
Óleo Diesel	Combustível Automotivo
Óleo Combustível	Industrial, Naval, Geração de Eletricidade
Gás Liquefeito de Petróleo (GLP)	Cocção
Querosene de Aviação	Combustível Aeronáutico
Querosene de Iluminante	Iluminação
Insumo Petroquímico	
Parafina	Velas, Indústria Alimentícia
Nafta	Matéria-prima Petroquímica
Propeno	Matéria-prima para Plásticos e Tintas
Outros	
Óleos Lubrificantes	Lubrificantes de óleos motores
Asfalto	Pavimentação

Fonte: COSTA, 2015.

De acordo com os pontos de ebulição, o petróleo bruto é separado em diferentes frações. Fatores como, características do petróleo, custos, necessidade do mercado e equipamentos disponíveis irão definir quais serão os produtos majoritários do processamento (SPEIGHT, 2014). A Figura 2 apresenta o esquema simplificado da destilação do petróleo, atmosférica e à vácuo, e as frações típicas com seus respectivos intervalos de ebulição.

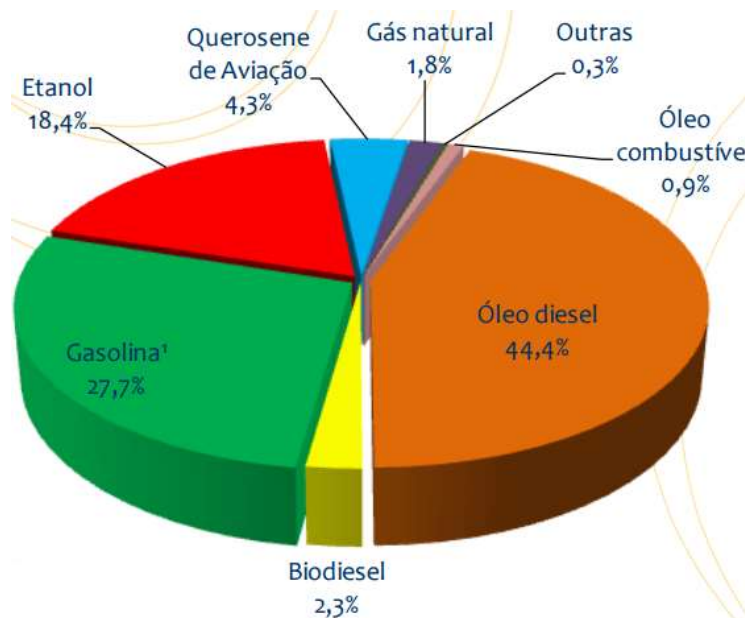
Figura 2. Esquema simplificado da destilação do petróleo.



Fonte: <http://www.engquimicasantosp.com.br/2012/08/refino-do-petroleo.html>

1.3.3 ÓLEO DIESEL

Entre os recursos energéticos mais utilizados encontram-se o carvão, o gás natural e o petróleo. Dentre estes, o petróleo é o que apresenta maior emprego na forma de combustíveis líquidos derivados. A gasolina e o óleo diesel são os principais, porém o diesel é o mais empregado nos motores de combustão interna de alta potência (ZHU et al., 2010; HEGEDUS; TEMPLE, 2011). A Figura 3 representa os dados preliminares da Empresa de Pesquisa Energética (EPE), vinculada ao Ministério de Minas e Energia (MME), e mostra o consumo de energia, no setor de transportes, no ano de 2015. O Balanço Energético Nacional (BEN) 2016, ano base 2015, demonstram que o petróleo e seus derivados lideram a lista de oferta interna de energia, sendo o óleo diesel o derivado mais consumido no setor de transportes.

Figura 3. Consumo de energia, no setor de transportes, no ano de 2015.

Fonte: Empresa de Pesquisa Energética, 2015.

O óleo diesel consiste em uma mistura complexa de compostos contendo enxofre, nitrogênio, oxigênio e alguns íons metálicos, e, principalmente, hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos, olefínicos e aromáticos constituídos por moléculas contendo de 8 a 40 átomos de carbono. É a matriz é predominantemente alifática que confere a propriedade de auto-ignição. Em geral, os hidrocarbonetos mono ou di aromáticos representam 22% da mistura, enquanto os compostos alifáticos e ciclo-alcanos correspondem a 40%. Todavia, a proporção entre os constituintes depende da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação. Podem-se somar a estas substâncias diversos aditivos, tais como: surfactantes, inibidores de corrosão e compostos que melhorem a estabilidade e ignição do óleo. É pouco volátil (a fração volátil corresponde de 5 a 10% do produto total), inflamável, medianamente tóxico, límpido, de coloração variando do amarelo ao marrom (possuindo fluorescência azul), de odor forte e característico, ponto de fulgor mínimo de 38°C e ponto de ebulição em intervalo de 180 a 380°C (Das & Chandran, 2011).

Entre os produtos oleosos obtidos a partir da destilação fracionada do petróleo bruto, o óleo diesel é o mais abundante. É um combustível amplamente empregado em motores de combustão interna e ignição por compressão (motores ciclo diesel). Isto

porque a instabilidade química e térmica do diesel, juntamente com as condições da câmara de combustão dos motores, são capazes de produzir uma explosão eficiente. Estes motores estão presentes nos automóveis de passeio, caminhões e caminhonetes, geradores elétricos, locomotivas, ônibus, pequenas embarcações marítimas e outros (CNT, 2011).

1.3.4 POLUIÇÃO AMBIENTAL MARINHA ENVOLVENDO PETRÓLEO E/OU SEUS DERIVADOS

No âmbito da gestão e planejamento ambiental o termo “ambiente” é muito amplo e pode incluir tanto a natureza como a sociedade.

A Lei da Política Nacional do Meio Ambiente, Lei 6938/81, define em seu art. 3º, I, Meio Ambiente como:

“O conjunto de condições, leis influências e interações de ordem física, química e biológica, que permite, abriga e rege a vida em todas as suas formas”.

Após a Constituição de 1988 foi atribuída uma conotação política ao conceito de “meio ambiente” e esse passou a ter um sentido de direito fundamental inerente ao ser humano. O artigo 255 da nossa Lei Fundamental dispõe:

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo, e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”.

O uso excessivo e indiscriminado dos recursos naturais geram danos ambientais ao solo, ar e água. O artigo 3º da Política Nacional do Meio Ambiente entende por poluição:

- “II – degradação da qualidade ambiental, a alteração adversa das características do meio ambiente;
- III – a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente:
 - a) prejudiquem a saúde, a segurança e o bem estar da população;
 - b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;
 - c) afetem desfavoravelmente a biota;
 - d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;
 - e) lancem matéria ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos”

As legislações estadual e municipal podem ampliar este conceito, contudo, não têm o poder de restringir seu alcance abaixo do estipulado pela Constituição Brasileira.

A intensificação das atividades marítimas tais como a pesca, a mineração e o transporte de substâncias tóxicas ao meio ambiente, tem aumentado os efeitos danosos à biota marinha (BISPO et al., 2012).

A extração de óleo em plataformas, produção, armazenamento, lavagem dos tanques de navios petroleiros e transporte de petróleo e seus derivados, em navios e oleodutos, já protagonizaram diversos acidentes ambientais. Na poluição do meio marinho, os impactos ambientais quando pontuais são classificados como agudos, e seus efeitos catastróficos se dão em um relativo curto espaço de tempo. Contudo, quando os danos ao meio ambiente se propagam ao longo do tempo, os impactos são qualificados como crônicos. Em qualquer que seja a classificação, especialistas

afirmam que os acidentes deixam sequelas que se estendem por 20 anos ou mais, e que a recuperação da área afetada é sempre muito difícil, mesmo com a intervenção humana (BISPO et al., 2012).

O petróleo derramado no mar forma na superfície uma película com espessura variável. Esta espessura pode ser estimada pela coloração da mancha, e com base nessa última é possível mensurar o volume derramado por unidade de área. Após o derrame a trajetória do poluente sofre alteração de acordo com a velocidade e a direção dos ventos superficiais e correntes marinhas. Densidade, fricção, inércia, viscosidade e tensão superficial são outros fatores que também influenciam no movimento horizontal do óleo na superfície da água. Desse modo, a mancha irá se expandir e ter sua espessura gradativamente reduzida. Ao longo do curso o material sofrerá ação da temperatura, salinidade, pH, umidade, radiação solar, bactérias e outros micro-organismos, que causarão alterações nas características físico-químicas do contaminante (SILVA, 2004).

Os hidrocarbonetos são capazes de causar inúmeros danos ao equilíbrio ecológico, além de comprometer os sistemas respiratório, digestório e do controle térmico biológico de peixes, aves e mamíferos aquáticos. Além destes, plânctons, bentos e pequenos crustáceos são outros exemplos de seres severamente atingidos durante os acidentes ambientais. O óleo derramado também afeta a realização da fotossíntese por algas marinhas, pois compromete a penetração da luz mesmo em águas superficiais (SILVA, 2004). A Tabela 4 descreve os efeitos da ação de derramamento de petróleo em comunidades biológicas.

Tabela 3. Efeitos da ação de derramamento de petróleo em comunidades biológicas

COMUNIDADE		EFEITO
Bactérias		Positivos para os grupos que degradam o óleo, com expressivo aumento das populações, e negativos para os grupos que não têm afinidade com o mesmo.
Plâncton	Biomassa e produtividade do fitoplâncton.	Aumento devido à diminuição da pastagem; depressão da clorofila a.
	Zooplâncton	Redução da população; contaminação.
Bentos	Anfípodas, isópodas, ostracodas.	Mortalidade inicial; população decresce.
	Moluscos, especialmente bivalves.	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia.
	Poliquetas oportunistas.	População aumenta.
	Comunidades dos macrobentos.	Decréscimo de diversidade.
Entre marés e litoral	Crustáceos e caranguejos	Mortalidade inicial; população decresce.
	Moluscos	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia.
	Poliquetas oportunistas.	População aumenta.
	Maioria das comunidades.	Decréscimo de diversidade.
Algas		Decréscimo de biomassa; espécies são substituídas.
Peixes	Ovos e larvas	Diminuição de eclosão e sobrevivência.
	Adultos	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia. Normalmente afastam-se do local atingido.
Aves	Adultos	Mortalidade por esgotamento físico (recobrimento), intoxicação; decréscimo populacional.

Fonte: CRAPEZ, 2001.

Muitas das substâncias lançadas ao mar, como resíduos das atividades humanas, se sedimentam no leito das águas oceânicas e podem gerar nutrientes que fertilizam as cadeias alimentares. Contudo, isto não ocorre com óleos derramados no ambiente marinho. Suas características tóxicas e poluentes fazem do petróleo e seus derivados uma substância capaz de ocasionar um desequilíbrio irreversível tanto do ecossistema aquático quanto terrestre. Entre as substâncias orgânicas constituintes, as mais tóxicas ao meio ambiente são hidrocarbonetos aromáticos seguidos das olefinas, naftênos e parafinas (BISPO, 2012).

De acordo com Bispo (2012) o grau de impacto das comunidades biológicas costeiras está diretamente relacionado com:

- Tipo e quantidade de poluente – os compostos aromáticos são os mais tóxicos;
- Amplitude das marés – derrames ocorridos durante as marés de sizígia (de maior amplitude) alcançam áreas muito mais extensas do que nas marés de quadratura.
- Grau de hidrodinamismo – Lugares com alto grau de hidrodinamismo apresentam maior tendência em dispersar o óleo de maneira rápida e eficiente.
- Tipo de comunidade – Ambientes como costões rochosos abrigados e praias lodosas (estáveis) são, em geral, mais ricos em espécies sensíveis e por isso mais passíveis de impactos severos. Já os ambientes com elevado stress físico, possuem espécies mais resistentes e menor diversidade. Mexilhões, ostras e espécie que apresentam carapaças e conchas são mais resistentes por haver menor contato direto com o poluente.
- Exposição prévia a outros impactos: Comunidades biológicas perturbadas e desestruturadas por exposição crônica apresentam baixa diversidade e são mais sensíveis aos impactos agudos.

Um dos maiores e mais antigos foi o naufrágio ocorrido na Costa da Cornualha (Inglaterra), em março de 1967. O petroleiro Torrey Canyon derramou em águas marítimas 120 mil toneladas de óleo cru, vitimando 15 mil aves. Em 1983, na África do Sul outro navio, o Castillo de Berver, protagonizou o vazamento de 260 mil toneladas de petróleo. E, em 1989, a Exxon (maior petrolífera do mundo), teve seu nome

envolvido em um dos maiores acidentes ambientais da história. O superpetroleiro Exxon Valdez, de 330 m de comprimento, despejou 41 milhões de litros de petróleo no Alasca, cobrindo 1.800 quilômetros de praias com uma camada de piche, que em alguns pontos atingiu 90 centímetros de espessura (LIMA, 2013).

No Brasil, o primeiro grande acidente ambiental envolvendo a indústria petrolífera ocorreu em agosto de 1974. No litoral norte de São Paulo, o petroleiro Takimyia Maru colidiu com uma rocha no Canal de São Sebastião, acarretando no vazamento de cerca de 6 mil toneladas. Em março do ano seguinte, no Rio de Janeiro, o navio Tarik Ibn Ziyad, derramou o volume semelhante de óleo na Baía de Guanabara.

Mais recentemente, na noite de 06 de abril de 2016, 2.500 litros de petróleo vazaram em mar aberto durante um descarregamento. Um temporal provocou o rompimento da mangueira que fazia a ligação de um navio da Transpetro (subsidiária da Petrobrás) à monobóia no terminal de Osório, no litoral do Rio Grande do Sul. Outro exemplo de acidente, nos últimos 5 anos, envolvendo dispersão de petróleo, e/ou seus derivados, foi o ocorrido em 04 de julho de 2014, no qual cerca de 4 mil litros de óleo foram derramados nas águas da praia de Tramandaí, litoral do Rio Grande do Sul. Em 22 de março de 2012, um acidente, com vazamento de petróleo, ocorrido em um terminal terrestre da Transpetro interrompeu o abastecimento de água na Baixada Santista, SP. Em menos de 20 dias um segundo acidente fez chegar novamente às praias de Tramandaí 33,6 mil litros de óleo, segundo o laudo da Fundação Estadual de Proteção Ambiental (Fepam) (PAMPLONA, 2016).

Desse modo, percebe-se que a descoberta de novos campos petrolíferos, a construção de oleodutos interestaduais e internacionais, refinarias e petroleiros transoceânicos, além da inauguração de portos e terminais de carga e descarga aumentaram os riscos de vazamentos e acidentes ambientais envolvendo petróleo e seus derivados (MARTINS et. AL, 2015).

Cada país apresenta uma legislação ambiental própria que determina o conjunto de ações que devem ser tomadas pela equipe de emergência em caso de contenção e recuperação de óleo. Por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA) o óleo derramado pode ser queimado, contudo, no Brasil, tal procedimento é proibido. A primeira resposta padrão nos EUA consiste na utilização de dispersantes químicos,

enquanto no Brasil, esta hipótese só é considerada quando recuperar e conter não forem procedimentos suficientes para remediar um vazamento. Em 04 de janeiro de 1993, foi criada a Lei 8617 baseada na Convenção de Montego Bay e voltada para as questões marítimas nacionais (LIMA et al., 2016).

Para que as ações de resposta sejam selecionadas e aplicadas de maneiras adequadas é primordial se conhecer o ambiente envolvido no acidente e o contaminante. Desse modo é possível definir estratégias e estimar os recursos necessários para uma recuperação eficiente.

1.3.5 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Consistem na retirada física de contaminantes, ou na modificação da natureza química destes, transformando-os em substâncias inócuas. Estes processos podem ser físicos, químicos ou biológicos e executados *ex situ* (fora da área contaminada) ou *in situ* (na área contaminada). São exemplos de métodos convencionais de descontaminação: a adsorção, biorremediação, biossorção, bioventilação, compostagem, diluição, extração, fitorremediação, precipitação química, troca iônica e volatilização (FOGHT 2008).

A biorremediação caracteriza-se por fazer uso de organismos vivos (bactérias, fungos ou plantas) para atenuação ou remoção dos contaminantes tóxicos. Quando o composto original sofre biodegradação completa ou mineralização, o mesmo é oxidado produzindo dióxido de carbono, água e energia, sendo esta última empregada na síntese do material celular (biomassa). Esta técnica consiste em uma alternativa economicamente viável para o tratamento de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados. Para isto, alguns fatores condicionantes, tais como, a concentração de nutrientes e de oxigênio, o pH, e a temperatura, devem ser avaliados para que haja melhor eficiência do método. Outros dois critérios fundamentais são a composição e quantidade do contaminante e as características físico-químicas e biológicas do ambiente contaminado. Também devem ser acompanhadas e, se possível controladas, as biotransformações para que não haja a produção de metabólitos tóxicos e/ou condições indesejáveis que inibam as atividades microbianas esperadas. As primeiras

análises de desempenho são, em geral, realizadas em laboratório. Com isso, é possível otimizar a eficácia da biodegradação do poluente (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; DECESARO, 2013; MUTECA, 2012).

Entre as técnicas de biorremediação *ex situ*, os biorreatores têm como diferencial a possibilidade de tratamento realizado em ambiente fechado. Isso permite o monitoramento, em tempo real do pH, das concentrações de oxigênio e nutrientes, da temperatura e do teor de água, tornando o tratamento mais rápido e eficiente, o que é de grande vantagem na degradação de compostos recalcitrantes (BERGER, 2005; MUTECA, 2012).

1.3.5.1 BIODEGRADAÇÃO

É um processo natural, que pode ocorrer sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, no qual agentes biológicos podem degradar compostos indesejáveis (CERQUEIRA; COSTA, 2009).

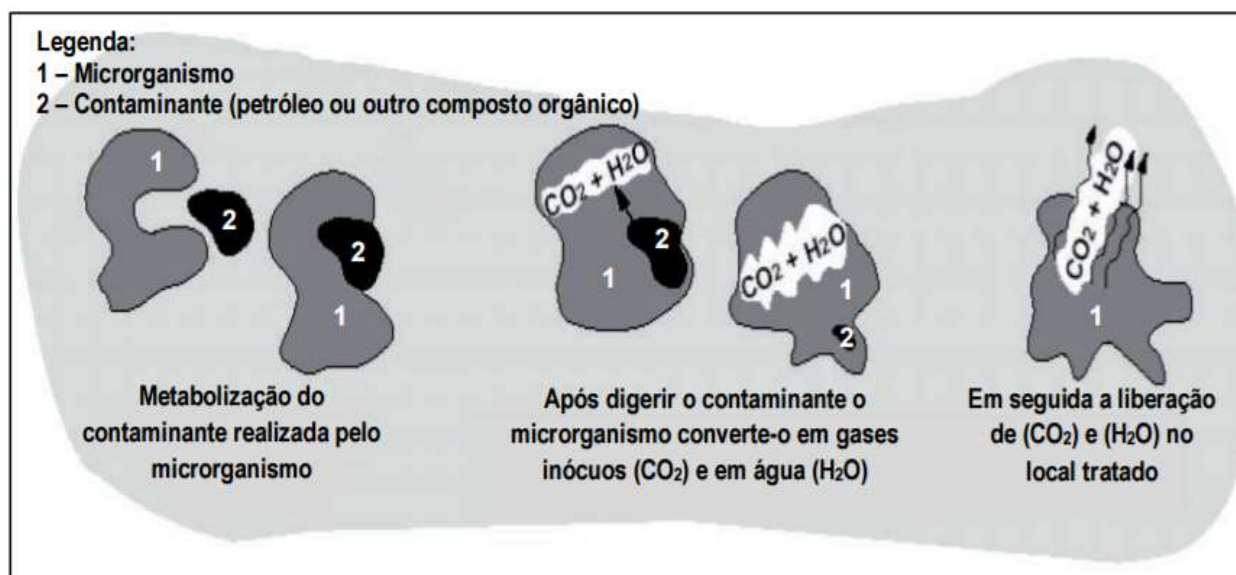
A versatilidade anabólica e catabólica, a abundância e diversidade de espécies e principalmente a capacidade de adaptação às condições adversas do meio fazem dos micro-organismos biodegradadores extremamente eficientes, e por isso muitos estudos têm sido desenvolvidos relacionando estes seres a biodegradação de petróleo e seus derivados (LIU et al., 2011; KUMARI; ABRAHAM, 2011; SOUZA; SALGUEIRO; ALBUQUERQUE, 2012; PINHATI et al., 2014; GONÇALVES; CERQUEIRA; QUINTELLA, 2014; ARAÚJO et al., 2014)

Embora se acredite que as bactérias sejam as principais responsáveis pelo processo de biodegradação de hidrocarbonetos, alguns fungos, leveduras (CERNIGLIA, 1977), algas, cianobactérias e protozoários (CERNIGLIA et al., 1979) também são capazes de realizar degradação. Como uma das etapas de conversão dos compostos orgânicos em CO₂ é a oxi-redução, em geral, esses organismos envolvidos são aeróbios.

Para derivados de petróleo, a biodegradação ocorre quando micro-organismos (bactérias e fungos) utilizam os hidrocarbonetos presentes na composição do material contaminante como fonte de alimentação. Nesse processo ocorre a conversão de

macromoléculas em compostos de baixa massa molecular. A princípio estes poluentes são transformados em subprodutos oxidados que, posteriormente, serão degradados em gás carbônico (CO_2) e água (H_2O). A Figura 4 representa um esquema simplificado da ação de micro-organismos sobre um contaminante (ZHANG et al., 2005; HEIDERSCHEIDT, 2016).

Figura 4. Esquema simplificado da ação de micro-organismo sobre um contaminante



Fonte: HEIDERSCHEIDT, 2016.

A velocidade de metabolismo dos compostos orgânicos, e sua biodegradação pelos micro-organismos, é variável e dependente do grau de concentração do poluente e das características e qualidade das espécies catalisadoras empregadas (HEIDERSCHEIDT, 2016). A biodegradação dos hidrocarbonetos de cadeia aromática, por exemplo, ocorre de maneira mais lenta que a de alcanos. Ainda assim, mesmo os compostos que persistem recalcitrantes têm minimizada sua capacidade de gerar impactos negativos sobre o meio ambiente. Além das variáveis citadas, pH, nível de oxigênio, disponibilidade de nutriente, umidade, temperatura e biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos são alguns dos fatores críticos que podem limitar a ação dos micro-organismos degradadores em meio aquoso (SILVA, 2004; SOUZA, 2009).

Os mecanismos de biodegradação de derivados de petróleo tanto podem ocorrer em condições anaeróbicas quanto aeróbicas. Contudo, estudos comprovam que a

degradação da maioria dos compostos orgânicos se torna mais rápida e completa em presença de oxigênio. Isto porque, em um processo oxidativo, o ataque intracelular inicial de compostos orgânicos consiste na reação enzimática catalisada por peroxidases e oxigenases, que está associado à incorporação e ativação desse gás (DAS; CHANDRAN, 2011).

A biodegradação dos alcanos de cadeia linear é iniciada pelo grupamento metil localizado na porção terminal da cadeia carbônica. Neste processo ocorre a formação de álcool primário que é oxidado a aldeído e por fim a ácido carboxílico. A reação de degradação do ácido carboxílico, via β -oxidação, acarreta na produção de acetil-coenzima A e de ácidos graxos com dois átomos de carbono a menos, além de eventual liberação de dióxido de carbono. O acetil-CoA, o piruvato e o succinato, provenientes do metabolismo central, são os precursores metabólicos da síntese da biomassa celular, enquanto que o crescimento e a biossíntese ocorrem a partir dos açúcares sintetizados via gliconeogênese (MADIGAN, 2012).

1.3.6 MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES

A presença de micro-organismos degradadores (bactérias, fungos e leveduras) auxilia na eficiência do processo de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (DAS; CHANDRAN, 2011, LIU et al., 2015). Em geral, eles podem atuar de duas maneiras: usando os contaminantes como fonte de alimento (e para seu metabolismo) ou produzindo substâncias que irão degradar os compostos residuais, tais como metabólitos secundários e enzimas (TRÖGL et al., 2012).

O processo de biodegradação microbiana no meio ocorre através da ação enzimática, tendo como resultado a decomposição de substâncias químicas xenobióticas que podem apresentar características tóxicas, cancerígenas e mutagênicas. Como resultado dessa ação ocorre a formação de água, dióxido de carbono, produtos orgânicos e inorgânicos, e metabólitos secundários (BOLLAG, 1992; VAZOLLER, 2001).

Uma das principais alternativas para remediação ambiental é a utilização de micro-organismos, uma vez que os mesmos possuem potencial biotecnológico, sendo mais eficientes quando comparado a outros processos (físicos e químicos), alta disponibilidade, menor custo com alta produtividade de metabólitos e não geraram resíduos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; POLONIO, et al., 2014).

Os fungos estão entre os micro-organismos mais utilizados nos processos de biodegradação. Isto porque além de uma alta capacidade de adaptação possuem também uma grande habilidade em decompor uma ampla gama de substratos, com os mais variados pesos moleculares, produzindo enzimas e subprodutos ao longo do processo que apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (SILVA; ESPOSITO, 2010; RHODEN et al., 2013).

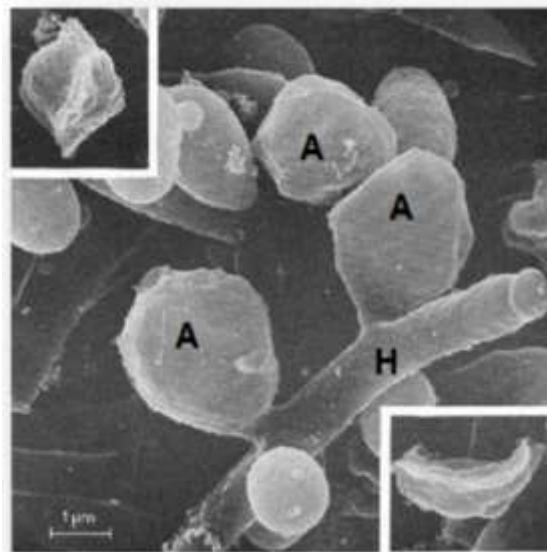
1.3.6.1 DIMORFISMO EM *CANDIDA LIPOLYTICA* (*YARROWIA LIPOLYTICA*)

Yarrowia lipolytica é um micro-organismo não patogênico, não fotossintético, eucarioto e aeróbio do reino fungi pertencente ao Phylum Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero e espécie *Candida lipolytica* (NICAUD, 2012; ZINJARDE, 2014; FABISZEWSKA; KOTYRBA; NOWAK, 2015). Inicialmente foi classificada como *Candida lipolytica* e devido à descrição do estágio sexual foi introduzida no grupo deuteromycetous. Em seguida, após terem sido observados os ascósporos foi reclassificada e renomeada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, por fim, *Yarrowia lipolytica* (BARTH e GAILLARDIN, 1997; GROENEWALD et al., 2014; OLIVEIRA, 2014; LIU; JI; HUANG, 2015)

Suas colônias têm coloração que variam de branca a creme, com características leveduriforme e cerebriforme, isto é, de consistência cremosa, aspecto umedecido e opaco com topografia de altos e baixos formando círculos em volta de um centro comum. Em geral, têm dimensões que variam de 3 à 7 µm de largura e de 3 à 14 µm de comprimento (RODRIGUES, 2006; GROENEWALD et al., 2014). Células apicais podem ultrapassar 100 µm de comprimento, por outro lado os segmentos estão em um intervalo de 50 a 70 µm. Cada segmento é mononuclear e os septos existentes

apresentam um poro central que não é encontrado com freqüência nas demais leveduras, com retículo endoplasmático que se estende de um segmento ao outro (BARTH; GAILLARDIN, 1997). A fisiologia, genética e evolução filogenética deste micro-organismo diferem bastante das leveduras convencionais, porém apresentam similaridades com a *Candida albicans* (ZHU; JACKSON, 2015). A Figura 5 apresenta um exemplo de microscopia eletrônica da *Candida lipolytica* e suas estruturas.

Figura 5. Microscopia eletrônica da *Candida lipolytica* (A) blastosporos, (H) hifas.



Fonte: WEBER, 2004.

Apresentam dimorfismo, ou seja, de acordo com as condições que compõem seu habitat, podem alternar morfológicamente entre as formas de leveduras (células ovóides) e hifas septadas (filamentos lineares sem constrictões aparentes) e/ou pseudohifas (cadeias formadas por células alongadas com constrictões visíveis e posicionamento de septo). A proporção morfológica presente em cada cultura depende da cepa utilizada. Condições adversas, tais como redução da disponibilidade nutricional e estresse anaeróbico, ou alterações da temperatura, composição do meio e pH extracelular, podem acarretar em uma mudança de aspecto morfológico como consequência de um mecanismo celular de defesa (RUIZ-HERRERA; SENTANDREU, 2002; SZABO; STOFANÍKOVÁ, 2002).

Quanto a disponibilidade nutricional, estudos realizados por Szabo e Stofaníková (2002), comprovam que a limitação de nitrogênio em culturas de *Candida lipolytica* inibe a formação de hifas, enquanto que o desenvolvimento desses filamentos não é afetado por restrições da fonte de carbono. No que se refere ao pH extracelular, a exposição dessa levedura a meios alcalino ou neutro estimula a predominância das formas filamentosas, enquanto que o meio ácido preponderam a forma de leveduras (RUIZ-HERRERA; SENTANDREU, 2002; SZABO; STOFANÍKOVÁ, 2002). Estudos sugerem haver na superfície celular da levedura um sensor de pH, e assim, as mudanças morfológicas ocorridas seriam consequência de alterações transcricionais desenvolvidas como resposta de variações do pH superficial (LI; MITCHELL, 1997; DAVIS et al., 2000).

Quanto ao estresse oxidativo e térmico, culturas de *Y. lipolytica* quando submetidas a estes fatores, apresentam um aumento expressivo tanto na formação de hifas como no comprimento das mesmas. O maior crescimento na forma de hifas é favorecido pela combinação, durante o cultivo, do estresse térmico (com temperaturas no intervalo de 29°C a 37°C) ao oxidativo (uso de peróxido de hidrogênio 1,0 mol.L⁻¹) (KAWASSE et al., 2003).

A maioria das cepas da *Yarrowia lipolytica* foram isoladas de ambientes marinhos contaminados com óleos, de solos e de redes de tratamento de esgoto. Isto é justificado pela afinidade deste micro-organismos por substratos ricos em proteínas e lipídeos (ISMAIL et al., 2001).

O rápido avanço das pesquisas relacionadas a esta levedura pode ser associado a facilidade de manipulação gênica decorrente de um ciclo celular bem definido.

Bankar, Kumar e Zinjarde (2009), relatam o isolamento de uma linhagem de *Candida lipolytica* com habilidade de degradar em um período de 10 dias, e a uma faixa de temperatura de 0 a 30°C, 68% de uma amostra de óleo diesel. Hassanshahian et al. (2012) isolaram e caracterizaram duas linhagens de leveduras degradantes de óleo bruto do Golfo Pérsico, *Yarrowia lipolytica* PG-20 e PG-32, que tinham elevada hidrofobicidade na superfície da célula e reduziram drasticamente a tensão superficial. Outros autores relatam a aceleração no processo de biodegradação de ambientes naturais contaminados através das técnicas de bioaumento e

bioestimulação, o que requer alterações na disponibilidade de nutrientes, nas concentrações de micro-organismos e nas condições ambientais (KARIGAR; RAO, 2011; MAHMOUD et al., 2015; ZINJARDE, 2014).

Para biorremediar ambientes marinhos contaminados por derivados de petróleo é imprescindível o uso de um micro-organismo com capacidade para assimilar com versatilidade uma gama de hidrocarbonetos e compostos aromáticos em condições de alta salinidade. A *Candida lipolytica* tem esta habilidade, e além de degradar substratos hidrofóbicos, metabolizando hidrocarbonetos e lipídeos, por exemplo, excreta em quantidades significativas, diferentes metabólitos tais como proteínas extracelulares e ácidos orgânicos, o que a torna interessante para aplicações biotecnológicas e industriais (BRÍGIDA et al., 2014; FABISZEWSKA; KOTYRBA; NOWAK, 2015; GROENEWALD et al., 2014).

Os agentes emulsificantes produzidos pela *Candida* ao longo da fermentação são capazes de estabilizar emulsões óleo-água. O Liposan, por exemplo, é um bioemulsionante com atividade maior que alguns emulsionantes naturais como o alginato, a caseína e a goma arábica (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985). Os níveis de lipídeos acumulados podem ultrapassar 50% da massa seca da célula, esta facilidade de absorção deste tipo de substrato decorre, possivelmente, da existência das inúmeras saliências na superfície celular, o que caracteriza esta levedura como uma oleaginosa. Esse processo envolve interações de Lewis, eletrostáticas (ou de Van der Waals) e hidrofóbicas (AGUEDO, 2003; RATLEDGE, 2005). A tolerância desta levedura não convencional a altas concentrações de sais e amplas faixas de pH e temperatura (5 a 32°C) está associada ao fato de ser produtora de enzimas extracelulares tais como proteases, lipases, esterases, fosfatases e RNases (DARVISHI, 2012; NICAUD, 2012; ZINJARDE, 2014).

1.3.7 QUIMIOTROPISMO

Tropismos são movimentos de mudança de direção de crescimento que ocorrem em organismos vivos ou suas partes devido ao estímulo de um fator externo. Quando o movimento ocorre em direção ao fator estimulante diz-se que é positivo. Quando ocorre em direção contrária, diz-se que é negativo. O tropismo é uma característica muito comum de vegetais, mas também pode ocorrer com outros organismos vivos, como os vírus ou os fungos (HOCH et al., 1987; ZHOU, STUMPF et al., 1991). A mudança de direção depende da direção de incidência do fator estimulante. De acordo com o tipo de agente estimulante, o tropismo pode ser classificado em:

Fototropismo: é a resposta de um organismo a uma fonte de luz. Os fungos também são condicionados pelo fototropismo.

Quimiotropismo: ocorre quando um organismo cresce direcionado por um estímulo químico como um mineral ou a água.

Geotropismo: esse movimento ocorre quando o crescimento se modifica de acordo com a ação da gravidade.

Tigmotropismo: esse tipo de crescimento ocorre quando o organismo ao crescer encontra um objeto sólido e se desenvolve ao redor dele. Nesse caso, para os vegetais, as células externas se alongam enquanto as células que entram em contato com o sólido se encurtam.

O quimiotropismo é essencial para o ciclo de vida dos fungos (DANIELS, 2006; SNETSELAAR et al, 1996). As células quimiotrópicas devem sentir em sua superfície pequenas diferenças de concentração que determinam a direção da fonte de gradiente químico. Um modelo já caracterizado consiste na resposta de acasalamento da levedura em formação, *Saccharomyces cerevisiae* (KING, INSALL, 2009; VAN HAASTERT, P.J.M.; DEVREOTES, 2004).

Segall (1993) foi o primeiro a relatar que as leveduras alinham seu crescimento a um gradiente, demonstrando que as projeções de acasalamento crescem em direção a uma fonte de feromônio sintético e sofrem reorientação quando o ponto fonte é movido. Verificou também, que uma resposta direcional precisa pode ser obtida quando um gradiente de 1% em todo diâmetro da superfície da célula da levedura. Posteriormente, estudos utilizando dispositivos microfluídicos e imagens de lapso de tempo confirmaram as observações iniciais de Segall e forneceram exemplos definitivos de quimiotropismo de leveduras *in situ* (ISMAEL, et.al, 2016; MOORE et. al, 2008; PALIWAL et.al, 2007).

Em levedura, como em muitos organismos, as mudanças na forma da célula podem ser separadas do crescimento direcional. Em condições de feromônio isotrópico, as células de levedura se tornam alongadas e formam projeções polares. Uma gama de proteínas é necessária para essas alterações morfológicas, algumas das quais são específicas do acasalamento, e outras estão mais geralmente envolvidas na polaridade celular, embora pareçam ter funções específicas em resposta ao feromônio. Esse processo é chamado de polarização "padrão" (MADDEN; SNYDER, 1992; DORER et al., 1995), e o local anterior do broto fornece a pista espacial para a formação da projeção de acasalamento. Além do receptor e da proteína G heterotimérica, a MAP cinase Fus3 dependente de feromônios e as proteínas Afr1 e Pea2 induzidas por feromônios são necessárias para a formação de projeções polares (CHENEVERT et al. 1994; VALTZ; HERSKOWITZ, 1996; MATHEOS et al. 2004). Outras proteínas necessárias para a polaridade celular são particularmente importantes para as alterações morfológicas em resposta ao feromônio. Alterações em forma de células dependentes de feromonios podem ser separadas do crescimento quimiotrópico. Isso pode ser, em parte, devido ao fato de que a maioria dos estudos sobre mudanças de formato celular foi realizada em concentrações saturantes de feromônios que podem mascarar os efeitos quimiotrópicos (ARKOWITZ, 2009).

1.3.8 BIOFILMES

Populações de uma única ou de múltiplas espécies microbianas, quando aderidas a superfícies bióticas e/ou abióticas (forma séssil), tais como epitélios, plásticos, vidros e aço inoxidável, ou quando suspensas em soluções (forma planctônica) podem originar ecossistemas coordenados – os biofilmes (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001, *apud* TELLES, 2011; TAN et al. 2014).

O acúmulo de biofilme em superfícies é um fenômeno natural que acontece em meios aquosos e resulta de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente. Estima-se que mais do que 90% dos micro-organismos vivem sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa vir a ser colonizada por eles (MACHADO, 2005).

A primeira publicação detalhada que descreve biofilmes foi descrita por Zobell em 1943, onde o autor iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios, principalmente, e em diferentes tipos de superfície que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas (LUCCHESI, 2006; CAIXETA, 2008).

Técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas foram empregadas por Costerton em 1978, o qual verificou que a maioria dos micro-organismos nos ambientes naturais se encontrava em comunidades fixas a uma superfície, e não na forma dispersa em suspensão. Os precursores da formação de biofilmes são os planctônicos, que se encontram em suspensão e são mais sensíveis a agressões ambientais que em sua forma séssil. Apesar disto, os micro-organismos planctônicos foram, durante muitos anos, referência para a seleção de agentes antimicrobianos (CAPELLETTI, 2006; MASCARENHAS FILHO et al, 2010).

Os biofilmes estão presentes nos mais diversos processos, tais como tratamento de efluentes, produção de biocombustíveis, biorremediação e produção de aditivos para aplicações químicas e alimentícias (SILVA; MARTINS, 2013; WU et al., 2013). A capacidade de biorremediação em ecossistemas aquáticos está relacionada, entre outros motivos, à(s) espécie(s) constituinte(s) do biofilme, à duração do ciclo de vida deste e à aptidão do mesmo em se distribuir nesses ambientes (BORDUQUI, 2011). Desse modo, vários estudos têm sido realizados em diferentes corpos hídricos tais

como reservatórios (BARBOSA et al., 2012), lagos (BORDUQUI, 2011), lagoas (FERNANDES et al., 2009), estações marinhas (BARBOZA, 2008), açudes e rios (CARAMUJO et al., 2008; TIEN et al., 2011).

Os micro-organismos presentes no biofilme são capazes não apenas de degradar compostos orgânicos específicos, mas também a matéria orgânica produzida por eles durante a biodegradação (AZIM, 2009; WU et al., 2014). Em geral, a maior eficácia na remoção de contaminantes se dá quando esse micro ecossistema atinge a fase madura, isto porque a estrutura e a composição do mesmo se encontra mais equilibrada (WU et al., 2013).

Sob condições de estresse os biofilmes apresentam melhores atividade metabólica, taxa de transferência de genes e sobrevivência quando comparados com as células planctônicas. Por isso, sua aplicação em atividades de biorremediação, embora recente, tem se tornado cada vez mais crescente (KIRCHMAN e MITCHELL, 1982, *apud* ARUTCHELVI et al., 2011). O uso de biorreatores e substratos artificiais auxilia na capacidade de absorção de nutrientes (por aumentar a concentração de micro-organismos por volume), fornece altas taxas de conversão (por se tratar de um processo mais estável), permite maior flexibilidade operacional, consiste em uma alternativa ecológica e econômica para a produção do biofilme e ainda maior taxa de biorremediação por unidade de reator (HAMED et al., 2003, *apud* MAIORANO, 2005; PARAMESWARAPPA et al. 2008; WU et al., 2013; PÉREZ, J. M., 2015).

Os micro-organismos presentes estão envoltos em uma complexa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e exibem diferentes fenótipos que variam de acordo com a taxa de crescimento microbiano, o meio e a transcrição genética (KIEDROWSKI; HORSWILL, 2011). A matriz tem papel fundamental na redução e/ou prevenção do contato com os agentes antimicrobianos, na adsorção de compostos do ambiente e na coesão da estrutura dos biofilmes, sendo assim, responsável pela sobrevivência dos mesmos (AZEVEDO; CERCA, 2012).

Desse modo, os biofilmes variam quanto à resistência fúngica, morfologia e composição das EPS (SENEVIRATNE et al., 2008; HASAN et al., 2009). Entretanto, em linhas gerais, se assemelham quanto à constituição: água (70 a 97% da massa total), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas, micro-organismos

(menos de 10% da matéria orgânica seca) e EPS (fração dominante da matéria seca, 70 a 95%) (CORNELISSEN et al., 2011; MACHADO, 2005).

Se comparados as formas planctônicas, apresentam uma superior resistência à carência de nutrientes e às alterações das características físico-químicas do meio. Assim sendo, as células quando integrantes do biofilme têm maior possibilidade de sobrevivência. Portanto, é sugerido que a biorremediação através da utilização deste ecossistema consiste em uma alternativa mais segura para micro-organismos contribuindo para uma degradação mais eficiente de substratos orgânicos, especialmente quando em situações de *stress* (LANGER et al., 2013; SREY et al., 2013; TAN et al., 2014).

É fazendo uso da energia liberada a partir da degradação dos compostos químicos (catabolismo) que os micro-organismos crescem e se reproduzem (MINATTI, 2009). A adesão dos micro-organismos à superfície, durante o processo inicial de formação do biofilme, pode ocorrer de maneira ativa ou passiva dependendo da motilidade das células microbianas. A primeira se dá como consequência da ação de forças gravitacionais, de difusão ou pela dinâmica dos fluidos. A segunda está intimamente relacionada com a habilidade de fixação da superfície celular. Esta etapa é reversível e as células aderidas sobre o substrato exibem apenas uma pequena quantidade de EPS (SREY et al., 2013). Fatores como presença de compostos orgânicos e inorgânicos, de autoindutores do *quórum sensing* (comunicação célula-célula), aparato celular do micro-organismo e características da superfície da bactéria podem influenciar nesta etapa (FORSYTHE, 2013; SIMÕES et al., 2010).

A Tabela 4, Apresenta outros importantes fatores que influenciam na formação e desenvolvimento do biofilme, classificando-os de acordo com sua origem.

Tabela 4. Fatores que influenciam a formação e o desenvolvimento de biofilmes

Superfície de Adesão	Fluído	Célula
Textura ou Rugosidade	Velocidade do fluxo	Moléculas sinalizadoras
Hidrofobicidade	Disponibilidade de nutrientes	Apêndices extracelulares
Química da Superfície	Temperatura	Substâncias poliméricas extracelulares
Carga	Cátions	Hidrofobicidade da superfície da célula
Película de Condicionamento	pH	
	Presença de antimicrobianos	

Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2010.

A interação e a ligação permanente dos micro-organismos com a superfície dão início à etapa irreversível. Nesta, o crescimento e a acumulação das micro-colônias juntamente com o aumento das EPS reforçam a ligação entre os micro-organismos e o substrato, o que auxilia na estabilidade de tensões provenientes do ambiente (SIMÕES et al., 2010).

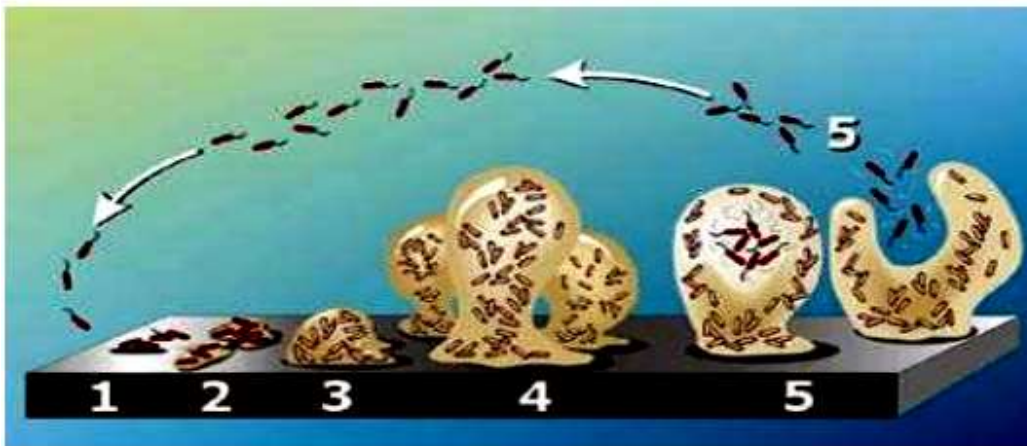
A etapa seguinte é a maturação. Neste passo ocorre o desenvolvimento de uma estrutura coordenada que pode ter forma de cogumelo ou plana, a depender da localização da fonte de nutrientes. O aumento da espessura do biofilme é consequência direta do acréscimo na produção e deposição de EPS e/ou na densidade populacional (que pode ocorrer por divisão celular, redistribuição entre as microcolônias ou adesão de novas células planctônicas). Por fim, ocorre o destacamento e a dispersão das células, com as mesmas voltando à forma planctônica e podendo formar um novo biofilme (SREY et al., 2013).

Os mecanismos genéticos ligados a dispersão não são ainda bem conhecidos. Existem três tipos de mecanismos de dispersão: (i) dispersão expansiva, quando parte das células de uma microcolônia sofre lise e outras retornam a motilidade, sendo então liberadas da estrutura; (ii) dispersão por fragmentação, quando envolve a fragmentação

do biofilme, onde porções de matriz extracelular associadas aos micro-organismos são liberadas e (iii) dispersão superficial, quando ocorre pelo crescimento do próprio biofilme como um todo (DAVEE; O'TOOLE, 2000).

A Figura 6 exemplifica, de maneira simplificada, a dinâmica de formação, diferenciação, maturação e destacamento de um biofilme monoespécie.

Figura 6. Dinâmica geral de formação e maturação de biofilme monoespécie



(1) Adesão dos micro-organismos ao substrato, fase reversível; (2) Aderência, imobilização dos micro-organismos ao substrato e formação de monocamada, fase irreversível; (3) Desenvolvimento da arquitetura do biofilme; (4) Maturação do biofilme; (5) Dispersão dos micro-organismos do biofilme para o ambiente (STLOODEY et al., 2002).

A capacidade de formação de biofilme em várias superfícies é sempre vantajosa para os micro-organismos, em termos de sobrevivência, metabolismo, adaptação e propagação (PEACOCK, et al, 2004; VAYSSE et al.,2009). Uma das principais limitações enfrentadas em processos de biorremediação é a biodisponibilidade de compostos orgânicos no local (SINGH et al, 2006). Estudos indicam que a biorremediação mediada por biofilme é uma abordagem eficiente e a opção mais segura, uma vez que as células em biofilme têm uma maior chance de sobrevivência e adaptação, especialmente em condições adversas (AL-AWADHI et al, 2003).

Estabelecimento de biofilmes sobre as partículas de cascalho e lâminas de vidro foi relatado por Al-Awadhi et al (2003), onde os micro-organismos artificialmente aderidos apresentaram excelente atenuação de petróleo bruto, em resíduos líquidos, em cultura em batelada (DASGUPTA et al, 2013).

1.3.9 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASSA

A identificação e quantificação, na água do mar contaminada por óleo diesel, dos hidrocarbonetos de natureza alifática e aromática policíclica podem ser realizadas através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (GC/MS) (VÉKEY, 2001).

A cromatografia consiste em um método analítico de separação de misturas, com base na interação diferencial de seus componentes com a fase estacionária e a fase móvel (LANÇAS, 1993).

A cromatografia gasosa (GC) é empregada para separação e análise de misturas cujos constituintes sejam voláteis e termicamente estáveis. A fase móvel é constituída por um gás inerte denominado “gás de arraste”. Ou seja, o mesmo carrega a amostra através da coluna de separação (fase estacionária), mas não reage com a mesma, com a fase estacionária ou com a superfície do instrumento. A coluna situa-se em um forno que pode ser programado para aumentar a temperatura gradualmente. Desse modo, os compostos que tem pontos de ebulição mais baixos deixam a coluna antes dos que tem pontos de ebulição elevados. Os componentes da mistura, após saírem da coluna de separação, atravessam um detector. Os compostos são detectados em tempos diferentes e o sinal eletrônico gerado, quando um composto elui na coluna cromatográfica, é processado em um computador e convertido a um cromatograma. Cada um dos picos no cromatograma representa o sinal criado pelo detector e reflete os aspectos quantitativos e qualitativos da amostra. Ou seja, quanto maior a concentração da amostra, maior a intensidade do pico. Fatores como tipo de coluna cromatográfica, valores de temperatura, pressão e concentração do analito influenciam no aspecto dos cromatogramas obtidos. O tempo inicial da injeção da amostra é denominado “tempo zero” e o instante em que ocorre a detecção do composto é intitulado como “tempo de retenção”. Ao se identificar o tempo de retenção é possível identificar o composto (CIOLA, 2000; HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009)

Um detector amplamente utilizado em GC é o de ionização de chama (FID). A queima da mistura composta pelo efluente da coluna, o gás hidrogênio e o ar, produz uma chama com energia suficiente para ionizar as moléculas com baixos potenciais de

ionização. A detecção da composição química da amostra fundamenta-se no monitoramento da corrente iônica produzida a partir dos íons provenientes dessa combustão (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Enquanto a cromatografia gasosa tem por objetivo separar os componentes de uma mistura, a espectrometria de massas (MS) visa determinar a estrutura de substâncias. Esta técnica é muito útil tanto na análise de compostos cujo espectro de massas é conhecido quanto nas quais a estrutura é completamente desconhecida. No primeiro caso, a identificação é feita de forma comparativa cruzando o espectro de massas em questão com outros contidos em um acervo bibliográfico. No segundo, a combinação das informações obtidas a partir do íon molecular, da sequência de fragmentações e de outros tipos de espectrometria possibilita a identificação do composto. De maneira geral, a técnica se baseia na fragmentação de moléculas a partir do bombardeio de compostos individuais, na fase gasosa, por um feixe de elétrons de alta energia. Os fragmentos formam íons, que são separados com base na razão massa/carga (m/z) e o número de íons que correspondem a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro. Um grupo de quatro eletroímãs (chamados de quadrupolo) é utilizado para discriminar cada fração. Um computador programa os quadrupolos para dirigirem somente determinados fragmentos de acordo com sua m/z , através da fenda. Para cada varredura é criado um gráfico que permite a identificação dos compostos. Algum tipo de cromatografia comumente antecede a introdução da amostra no espectrômetro de massas e a combinação desta técnica com a cromatografia gasosa é denominada GC/MS (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

1.3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os efeitos de difração limitam a resolução das análises em microscopia óptica convencional e muitas vezes detalhes menores se tornam imperceptíveis. Para que haja um aumento na qualidade da resolução é possível utilizar como fonte de iluminação da amostra uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível. Além das questões referentes à fonte de iluminação, a relação inversamente proporcional existente entre os aumentos realizados e a profundidade do campo

implica, muitas vezes, na necessidade de ocorrência de um polimento perfeito na superfície a ser observada, o que nem sempre é compatível com a análise em microscopia óptica (KESTENBACH, 1994).

O microscópio eletrônico de varredura diferencia-se dos convencionais por utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, ao invés de fótons, para explorar a superfície da amostra ponto a ponto. Uma tela catódica, cuja varredura está em sincronia perfeita com o feixe incidente, recebe do detector o sinal de imagem resultado da interação entre a superfície da amostra e o feixe acelerado pela tensão gerada entre o ânodo e a fonte de elétrons. A tensão de aceleração é um dos principais fatores para determinar o volume de interação decorrente da difusão dos elétrons, sendo este consequência da incidência do feixe primário sobre a amostra. Desse modo, as imagens obtidas são fruto das ondas eletromagnéticas produzidas e dos elétrons associados a este volume. Sendo a energia com a qual os raios e partículas são capturados pelo detector fatores determinantes para a resolução espacial e a profundidade máxima de detecção (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A possibilidade de combinação da microanálise química com a microestrutural e a obtenção de imagens tridimensionais com grande profundidade de foco contribuíram significativamente para a disseminação da técnica de MEV. As imagens obtidas são de caráter virtual, apresentam alta resolução e podem sofrer ampliação de até 300.000X (MANNHEIMER, 2002).

É possível identificar em diferentes áreas, trabalhos relacionados à utilização da MEV, inclusive para análise da estrutura de filmes biodegradáveis. Estes estão no campo da odontopediatria (ROCHA, 2007), da bioengenharia (BETTIO, 2010), da ciência e tecnologia de alimentos (ALMEIDA, 2015), da química orgânica e biológica (BOCELLI, 2016), da microbiologia e higiene de alimentos (COSTA et al., 2014), e outras.

Durante a análise, as interações elétron–amostra são capazes de fornecer dados como campo magnético local, composição, potencial eletrostático, topografia e outros. Essa análise microestrutural permite compreender as correlações microesstrutura – propriedades dos materiais, o que é fundamental quando se deseja prever características do biofilme (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUEDO, M.; BENEY, L.; WACHE, Y.; BELIN, J. M. Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 258–265, 2003.

AL-AWADHI, H.; AL-HASAN, R. H.; SORKHOH, N. A.; SALAMAH, S.; RADWAN, S. S. Establishing oil-degrading biofilms on gravel particles and glass plates. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 3, p. 181–185, 2003.

ALBUQUERQUE, C.D.C. *Produção de Biossurfactante por Candida lipolytica: Otimização, Ampliação de Escala e Desenvolvimento de Software Sensor baseado em Redes Neurais Artificiais*. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ALMEIDA, D. G de; SILVA, R. C. F. S da; BRASILEIRO, P. P. F.; LUNA, J. M de; SARUBBO, L. A.; Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura candida tropicalis a partir de resíduos industriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ 2014, São Paulo. *Anais...* São Paulo: BLUCHER, 2015. p. 2686–2693.

ALMEIDA, G. W. R. *Desenvolvimento e caracterização de filme nanocompósito de base celulósica e sua avaliação como embalagem ativa antimicrobiana*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

AMORIM, C. Uma visão brasileira do panorama estratégico global. **Contexto Internacional**, v. 33, n. 2, p. 265–275.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p.17–43, 2010.

ANDREWS, S. P. China'S Oil Import Strategies. Centre For Energy, Petroleum And Mineral Law And Policy. University Of Duendee. United Kingdom. 2004.

ARAÚJO, M. A.; GONÇALVES, C.; NASCIMENTO, E. M.; JÚNIOR, J. M.; SILVA, J. C.; OLIVEIRA, M. A.; BRISA, P.; PIRES, P. H.; MACHADO, E. C. Protocolo para biorremediação de águas contaminadas por petróleo e derivados. **E-xacta**, v. 7, n. 1, p. 55–63, 2014.

ARUTCHELVI, J.; JOSEPH, C.; DOBLE, M. Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 37–45, 2011.

AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na saúde, no ambiente, na indústria**. 1. ed. Porto: Publindústria, Edições Técnicas, 2012.

AZIM, M. E. **Photosynthetic periphyton and surfaces**. In: LIKENS, G. E. (Ed.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Amsterdam: Boston: Elsevier, 2009.

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

BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 847–865, 2009.

BARBOSA, J. E. L.; et. Al; Aquatic systems in semi-arid Brazil: limnology and management. **Acta Limnologica Brasiliensia**. v. 24, n. 1, p. 103–118, 2012.

BARBOSA, L. L.; SAD, C. M. S.;MORGAN, V.G.; SANTOS, M. F. P.; CASTRO, E. V. R. Time-Domain Proton Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics for Identification and Classification of Brazilian Petroleum. **Energy Fuels**, v. 27, n. 11, p. 6560–6566, 2013.

BARBOZA, G. *Remoção dos nutrientes de sistemas de cultivo de camarões com biofilme associado à bacia de sedimentação*. 2008. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

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

BERGER, T. M. *Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm*. 2005. Tese (Doutorado em Ecologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.cer

BETTIO, G. S. *Estudo da aderência e formação de biofilme de Candida spp. em cateter urinário confeccionado em látex siliconizado e silicone total*. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

BISPO, A. D. R.; ARAÚJO, F. V.; JÚNIOR, F. C. C.; BARROS, J. M. F.; MARQUES, L. T. F. Plano de Contingência na Indústria Petrolífera: O uso da pipoca e do isopor. **Cadernos de Graduação – Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 1, n. 15, p. 45–52, 2012.

BOCELLI, M. D. *Estudo da atividade de chalconas no controle de biofilmes bacterianos*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

BOLLAG, J. M. Decontaminating soil with enzymes. **Environmental science & technology**, v. 26, n. 10, p. 1876–1888, 1992.

BORDUQUI, M. *Avaliação sucessional da estrutura e estado nutricional da comunidade perifítica e sua interrelação com o fitoplâncton, em pontos de entrada de água de nascente e efluente doméstico, em reservatório hipereutrófico*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

BRÍGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic**, v. 101, p. 148–158, 2014.

CAIXETA, D. S. *Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável*. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAPELLETTI, R. V. *Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais*. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARAMUJO, M. J.; MENDES, C. R. B.; CARTAXANA, P.; , BROTAS, V.; BOAVIDA, M. J. Influence of drought on algal biofilms and meiofaunal assemblages of temperate reservoirs and rivers. **Hydrobiologia**. v. 598, n. 1, p. 77–94, 2008.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1 – naphthol from naphthalene *Agmenellum quadruplication* strain PR – 6. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 88, p. 50–58, 1979.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T. Metabolismo f naphthalene by *Cunningbamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, p. 363–370, 1977.

CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 2, 2009.

CETESB (2016) – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em <<http://emergenciasquimicas.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/53/2013/12/Principais-acidentes-internacionais.pdf>> Acesso em: 08 Abril de 2018.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.

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.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846–850, 1985.

CNT – Confederação Nacional de Transporte. Procedimentos para a preservação da qualidade do óleo diesel B – Brasília: CNT, 2011. Disponível em: www.cnt.org.br/Imagens%20CNT/.../Biodiesel_COMPLETO.pdf. Acessado em 10 de abril de 2018.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. (2010). **Yarrowia lipolytica: an industrial workhorse**. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, (Méndez Vilas, A., Ed.), Formatex, Badajoz, 2, 930–940.

CORNELISSEN, A.; CEYSSSENS, P. J.; T'SYEN, J.; VAN PRAET, H.; NOBEN, J.P.; SHABUROVA, O. V.; KRYLOV, V.N.; VOLCKAERT, G.; LAVIGNE, R. The T7-related *Pseudomonas putida* phage $\phi 15$ displays virion-associated biofilm degradation properties. **PloS one**, v. 6, n. 4, 2011.

COSTA, K. A. D.; FERENZ, M.; NUNES, J. S.; ALVES, E.; SILVEIRA, S. M.; MILLEZI, A. F.; Formação de Biofilmes por *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomonas Aeruginosa* em Diferentes Superfícies Utilizadas em Indústrias de Alimentos. **Blucher Food Science Proceedings**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 573–574, 2014.

COSTA, P. F. F. *Otimização da logística de operação de navios aliviadores de petróleo usando programação matemática*. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Departamento de Engenharia Industrial, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CRAPEZ, M.A.C. **Efeitos de poluentes em organismos marinhos**. Rio de Janeiro: Arte e Ciência Villipress, 2001.

DANIELS, K.J.; SRIKANTHA, T.; LOCKHART, S.R.; PUJOL, C.; SOLL, D.R. Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. **Embo Journal**, 25(10), p. 2240–52; 2006.

DARVISHI, F. Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 634–641, 2012.

DASGUPTA, D.; GHOSH, R.; SENGUPTA, T.K. Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil Degradation by Newly Isolated *Pseudomonas* Species. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, 2013.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: Na overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.

DAVEE, M.E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847–867, 2000.

DAVIS, D.; WILSON, R.B.; MITCHELL, A.P. RIM101-Dependent and -Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biology**, 20: 971-978, 2000.

DECESARO, A. *Bioestimulação de solo contaminado por compostos oleosos com biomassa microbiana inativa*. 2013. TCC (Graduação em Curso de Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. 1. ed. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

DHAR, K., DUTTA, S., ANWAR, M.N. Biodegradation of petroleum hydrocarbon by two *Aspergillus* spp. and two *Penicillium* spp. isolated from the contaminated soil and water

of ship breaking yard. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 14, p. 143–148, 2012.

FABISZEWSKA, A. U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 1495–1503, 2015.

FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados: definição, constituição, especificações, características de qualidade**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

FERNANDES, V.; CAVATI, B.; SOUZA, B. A.; MACHADO, R. G.; COSTA, A. G. Lagoa Mãe-Bá (Guarapari-Anchieta, ES): Um ecossistema com potencial de floração de cianobactérias? **Oecologia Brasilienses**, v. 13, n. 2, p. 366–381, 2009.

FOGHT, J. 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. **Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 93–120, 2008.

FORSYTHE, S. J. **The microbiology of safe food**. 2. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2013.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência, Tecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 34, p. 36–43, 2005.

GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. The use of methyl ricinoleate in lactone production by *Yarrowia lipolytica*: Aspects of bioprocess operation that influence the overall performance. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, p. 227–234, 2010.

GONÇALVES, O.; CERQUEIRA, G. S.; QUINTELLA, C. M. Biorremediação microbiológica de áreas impactadas com petróleo através do uso de fungos e subprodutos do biodiesel de mamona: Mapeamento patentário. **ProspeCT&I**, v. 6, n. 2, p. 144–151, 2014.

GROENEWALD, M. BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; DIJCK, P. W. M. V.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews Microbiology**, v. 40, p. 187–206, 2014.

HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B. C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes and infection**, v. 11, n. 8–9, p. 753–761, 2009.

HASSANSHAHIAN, M., TEBYANIAN, H., CAPPELLO, S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1386–1391, 2012.

HAZIN, F. H. V. Apresentação: a Amazônia azul e a sua herança para o futuro do Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 3, 2010.

HEGEDUS, L. L.; TEMPLE, D. S. **Viewing America's Energy Future in Three Dimensions**, RTI Press International: USA, 2011.

HEIDERSCHEIDT, D.; PEREIRA, J.; BURGHARDT, J. E.; SILVA, L. A.; OLIVEIRA, S. C. Conceitos aplicados à poluição do solo decorrente do derrame de petróleo e seus derivados, **Revista Maiêutica**, v. 4, n. 1, p. 7–14, 2016.

HOCH, H.C., STAPLES, R.C., WHITEHEAD, B., COMEAU, J. AND WOLF, E.D. Signalling for growth and orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. **Science**, v. 235, p. 1659–1662, 1987.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

ISMAEL, A.; TIAN, W.; WASZCZAK, N.; WANG, X.; CAO, Y.; SUCHKOV, D., BAR, E.; METODIEV, M.V.; LIANG, J.; ARKOWITZ, R.A.;l. Gb promotes pheromone receptor polarization and yeast chemotropism by inhibiting receptor phosphorylation. **Science Signal**, 9(423):ra38, 2016.

ISMAIL, S. A. S.; DEAK, T.; ABD EL – RAHMAN, H. A.; YASSIEN, M. A. M.; BEUCHAT, L. R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 13–19, 2001.

JANSSON, H.-B., JOHANSSON, T., NORDBRING-HERTS, B., TUNLID, A. AND ODHAM, G. Chemotropic growth of germ tubes of *Cochliobolus sativus* to barley roots or root exudates. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v. 90, p. 647–650, 1988.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

KAWASSE, F. M.; AMARAL, P. F. ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z. Morphological analysis os *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 371–375, 2003.

KESTENBACH, H. J.; BOTA FILHO, W. J. **Microscopia eletrônica transmissão e varredura**. 1. ed. São Paulo: ABM, 1994.

KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, p. 104–121, 2011.

KING, J.S.; INSALL, R.H. Chemotaxis: finding the way forward with *Dic- tyostelium*. **Trends Cell Biology**, 19(10): p. 523-30, 2009.

KUMARI, M. & ABRAHAM, J. Biodegradation of diesel oil using yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 5, p. 369–377, 2011.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. 1. ed. São Carlos: Editora Acta, 1993.

LANGER, S.; SCHROPP, D.; BENGELSDORF, F. R.; OTHMAN, M.; KAZDA, M. Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste. **Anaerobe**, v. 29, p. 1–8, 2013.

LIMA, A. J. R. *Simulação de contenção e recuperação de petróleo em mar aberto utilizando técnicas de realidade virtual*. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIMA, A. J. R.; HAGUENAUER, C. J.; CUNHA, G. C. C.; LANDAU, L. Capacitação de profissionais de service com uso de realidade virtual: O simulador de contenção de petróleo em mar aberto. **Revista Ensino de Ciências**, v. 7, n. 1, 2016.

LI, W.; MITCHELL, A.P. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. **Genetics**, v. 145, p. 63–73, 1997.

LIU, H. H.; JI, X. J.; HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1522–1546, 2015.

LIU, J.; CHEN, Y.; XU, R.; JIA, Y. J. Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oilfield wastewater. **Indian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 1522–1546, 2015.

LIU, P.W.G., CHANG, T.C., WHANG, L.M., KAO, C.H., PAN, P.T., CHENG, S.S. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 1119–1127, 2011.

LUCCHESI, E. G. *Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MACHADO, S. M. O. *Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis*. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade de Minho, Braga.

MADIGAN M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Biology of Microorganisms**. 13. ed. San Francisco: Pearson Education, 2012.

MAHMOUD, G. A. E.; KOUTB, M. M.; MORSY, F. M.; BAGY, M. M. Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. **European Journal of Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 70–77, 2015.

MAIORANO, A.; E., FIERI, M. Z.; CARTER, J. M.; COSTA, A. J. M.; LEITE, J. V.; SANCHEZ, C. R.; MAGOSSO, L. R.; ANDRADE, R. J.; TERRA, M. H. Influência das condições de aeração no tratamento de efluentes fenólicos com biofilmes em reator aeróbio. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 285–289, 2005.

MANNHEIMER, W. *Microscopia dos Materiais - Uma Introdução* 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2002.

MARTINS, S. S. S.; SILVA, M. P.; AZEVEDO, M. O.; SILVA, V. P. Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. **Holos**, v. 6, 2015.

MASCARENHAS F. C. C.; ALVES, A. J. G.; HIRANO, M. H.; MASCARENHAS, C.C. Um estudo sobre os impactos dos biofilmes microbianos nas indústrias. In: **XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba, p.1-6, 2010.

MELLO, J. M. M.; *Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme*. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MINATTI, G.; *Biodegradação dos compostos BTX de efluente petroquímico sintético*. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MOORE, T.I.; CHOU, C.S.; NIE Q.; JEON N.L.; Yi T.M. Robust spatial sensing of mating pheromone gradients by yeast cells. **PLoS One**, 3(12), 2008.

MUTECA, F. L. L. *Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola*. 2012. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**. v. 29, n. 10, p. 409–418, 2012.

OLIVEIRA, A. C. D.; FERNANDES, M. L.; MARIANO, A. B. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1503–1511, 2014.

PALIWAL, S.; IGLESIAS, P.A.; CAMPBELL, K.; HILLOTI, Z.; GROISMAN, A.; LEVCHENKO, A. MAPK-mediated bimodal gene expression and adaptive gradient sensing in yeast. **Nature**, 446(7131), p. 46-5, 2007.

PAMPLONA, N. Acidente em terminal de petróleo no RS derrama 2.500 litros no mar. [07 de abril, 2016]. São Paulo: Folha de São Paulo.

PARAMESWARAPPA, S.; KARIGAR, C.; NAGENAHALLI, M. Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2. **Biodegradation**, v. 19, p. 137–144, 2008.

PEACOCK, A. D.; CHANG, Y. J.; ISTOK, J. D. Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 3, p. 284–292, 2004.

PÉREZ, J. M. *Biofilme e macrófitas como ferramenta de biorremediação em ecossistemas aquáticos e tratamento de esgotos*. 2015. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento) – Ciências Biológicas, Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PINHATI, F. R.; AGUILA, E. M. D; TORRES, A. P. R.; SOUSA, M. P. de; SANTIAGO, V. M. J.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V. M. F. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Química Nova**. v. 37, n. 8, p. 1269–1274, 2014.

RATLEDGE, C. **Single cell oils for the 21st century**. In: COHEN, R. (Ed.). *raw glycerol waters*. Landbauforschung Völkenrode. Berlin. v. 55, n. 4, p. 261–267, 2005.

RHODEN, S. A.; GARCIA A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. In silico analysis of diverse endophytic fungi by using ITS1-5,8S-ITS2 sequences with isolates from various plant families in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 935–950, 2013.

ROCHA, C. T. *MEV – Biofilme apical em dentes decíduos de humanos, com e sem vitalidade pulpar*. 2007. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135–42, 2006.

RUIZ-HERRERA, J.; SENTANDREU, R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 6, p. 477–483, 2002.

SÁNCHEZ, R.; TODOLÍ, J. L.; LIENEMANN, C. P.; MERMET, J. M. Determination of trace elements in petroleum products by inductively coupled plasma techniques: A critical review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, n. p. 104–126, 2013.

SEGALL, J.E. Polarization of yeast cells in spatial gradients of alpha mat- ing factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, 1993, 90(18), p. 8332–6;

SELLEY, R. C. UK Shale Gas: The Story so Far. **Marine and petroleum geology**, v. 31, n. 1, p. 100–109, 2012.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582–590, 2008.

SILVA, P. R. *Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais*. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, E. P.; MARTINIS, E. C. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. ***Applied microbiology and biotechnology***, v. 97, n. 3, p. 957–968, 2013.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. *Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul (EDUCS), 2010.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. ***LWT – Food Science and Technology***, v. 43, n. 4, p. 573 – 583, 2010.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. ***Trends in Microbiology***, v. 14, n. 9, p. 389–397, 2006.

SNETSELAAR, K.M.; BOLKER, M.; KAHMANN, R. *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward Pheromone Sources. ***Fungal Genetics and Biology***, 20(4), p. 299–312, 1996.

SOUZA, F. A. S. D. *Biodegradação de óleo diesel por Candida lipolytica em água do mar*. 2008. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife.

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

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, n. 1, 2012.

SPEIGHT, J. G. **The Chemistry and Technology of Petroleum**. 5. ed. New York: CRC Press, 2014.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

SZABO, R., ŠTOFANIKOVÁ, V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 45–50, 2002.

SZKLO, A. S.; ULLER, V. C.; BONFÁ, M. H. P. **Fundamentos do Refino do Petróleo**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

TAN, S.; CHEW, S. C.; TAN, S.; GIVSKOV, M.; YANG, L. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilmes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 1–6, 2014.

TELLES, E. M., *A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão*. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Especialista em produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.M., GAILLARDIN, C. (2009) **Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica***, in: T. Satyanarayana, G. Kunze (eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 589, Springer Science and Business Media B.V.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

TIEN, C. J.; CHUANG, T. L.; CHEN, C. S. The role of naturally occurring river biofilms on the degradation of diazinon. **Clean-Soil, Air, Water**, v. 39, p. 931–938. 2011.

RÖGL, J.; CHAUHAN, A.; RIPP, S.; LAYTON, A. C.; KUNCOVÁ, G.; SAYLER, G. S. *Pseudomonas fluorescens* HK44: Lessons Learned from a Model Whole-Cell Bioreporter with a road Application History. **Sensors**, v. 12, n. 2, p. 1544–1571, 2012.

VAN HAASSTERT, P.J.M.; DEVREOTES, P.N. Chemotaxis: signalling the way forward. **Nat Rev Mol Cell Biology**, 5(8), p. 626-34, 2004.

VAYSSE, P. J.; PRAT, L.; MANGENOT, S.; CRUVEILLER, S.; GOULAS, P.; GRIMAUD, R. Proteomic analysis of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm formation at the alkane-water interface reveals novel proteins and cellular processes involved in hexadecane assimilation. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 10, p. 829–837, 2009.

VAZOLLER, R.F. **Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável – Microbiologia e saneamento ambiental**. In: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Microbiologia ambiental. São Paulo: CETESB, p.168, 2001.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal Chromatography**, v. 921, p. 227–236, 2001.

VIEIRA, M. R. S. *Estudo dos processos de corrosão e biocorrosão causados por fluidos da indústria de petróleo*. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

WEBER, H. *Yarrowia lipolytica*: The fungal genomics resource. Jul 2004. Disponível em: <<http://genome.jgi.doe.gov/Yarli1/Yarli1.home.html>>. Acesso em: 05 jan. 2018.

WU, J.; XIA, L.; YU, Z.; SHABBIR, S.; KERR, P. G. In situ bioremediation of surface Waters by periphytons. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 367–372, 2013.

YANG, Q.; Wang, J.; Wang, H.; Chen, X.; Ren, S.; Li, X.; Xu, Y.; Zhang, H.; Li, X. Evolution of the microbial community in a full-scale printing and dyeing wastewater treatment system. **Bioresource Technology**, v. 117, p.155–163, 2012.

ZHANG, G. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n. 8, p. 725–730, 2005.

ZHU, L.; ZHANG, W. ; LIU, W.;HUANG, Z. Experimental study on particulate and NOx emission of a diesel engine fueled with ultra low sulfur diesel, RME – diesel blends and PME – diesel blends. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1050–1058, 2010.

ZINJARDE, S. S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. **Food Chemistry**, v. 152, p. 1–10, 2014.

ZHOU, X.L., STUMPF, M.A., HOCH, H.C. AND KUNG, C. A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. **Science**, v. 253, 1415–1417, 1991.

Capítulo 2

Artigo submetido ao periódico International Biodeterioration & Biodegradation.

Dimorphism, chemotropism and biofilm formation in diesel biodegradation process by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater

Lilianne Gonçalves Lima Marques^{a, b, d}, Alan Souza Barros Junior^{a, b}, Hamilton Felix Nobrega^{a, b}, David Lima Cavalcanti^f; Grayce Kelli Barbosa da Silva^b; Elias Jose da Silva^f, Rosileide Fontenele da Silva Andrade^{a, b}; Marcos Antonio Cavalcanti Luna^f; Luciana de Oliveira Franco^e; Galba M.Campos-Takakia^{b, c}, Marcos Antonio Barbosa lima^e, Clarissa Daisy Costa Albuquerque^{a, b, c*}

^a Master in Development of Environmental Processes,
Catholic University of Pernambuco,
Rua Almeida Cunha, 245, Bloco G4, 8º andar, 50050-480, Boa Vista, Recife, PE, Brazil.

^b Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology,
Catholic University of Pernambuco
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, 50050-590, Boa Vista, Recife, PE, Brazil.

^c Science and Technology Center
Catholic University of Pernambuco
Rua do Príncipe, 526, Bloco A, 1º andar, 50050-900, Boa Vista, Recife, PE, Brazil.

^d Federal Institute of Alagoas

^e Federal Rural University of Pernambuco

^f Federal University of Pernambuco

* Corresponding author

Phone: +55 81 21194017

address E-mail: cdaisy@unicap.br

ABSTRACT

We investigated and demonstrated the ability of *Candida lipolytica* UCP 0988 grow without acclimatization in natural sea water contaminated with diesel fuel B7 and degrading aliphatic hydrocarbons and fatty biodiesel acids, with the support of chemotropism phenomena, dimorphism and training biofilm on glass surfaces and stainless steel bioreactor batch stirred tank type, used as model for physical simulation in laboratory scale bioremediation *ex situ* seawater polluted with hydrocarbons. Photographic records, visual inspection, optical microscopy and scanning electron were used to monitor the phenomena of chemotropism, dimorphism and biofilm formation. Chromatography using detector flame-mass spectrometry ionization was used to identify and determine the percentage of overall and individual biodegradation 13 open-chain alkanes, one alkane branched-chain, 2 isoprenoids alkanes from diesel and 3 methyl esters from biodiesel. Total removal percentage equal to 47.95%, 94.63% and 97.72% respectively were obtained at 1, 49 and 69 days. The bioremediation system model *ex situ* proposed, has potential for use in bioremediation of sea water contaminated with petroleum hydrocarbons. 63% and 97.72% respectively were obtained at 1, 49 and 69 days. The bioremediation system model *ex situ* proposed, has potential for use in bioremediation of sea water contaminated with petroleum hydrocarbons.

Key words: Biodegradation Hydrocarbons, Oil, Biodiesel; Scanning Electron Microscopy; Gas Chromatography; Marine Bioremediation.

1. Introduction

In the twenty-first century, human activities related to the oil industry, such as effluent disposal and accidents with storage tanks, ships and oil platforms, continue contaminating oceans and seas with alarming form of hydrocarbons. The process of natural attenuation of hydrocarbons in oceans and seas is slow. To speed up the processing of marine environments impacted by oil and derivatives, various techniques physical, chemical and biological constantly have been developed, optimized, tested, validated and applied.

Strategies for improving the efficiency of biodegradation include genetic engineering to improve varieties and chemostactic ability, the use of biofilms of mixed population and optimization of physicochemical conditions (Singh et al., 2011) .

Biofilms are organized communities of marine various species of microorganisms encapsulated by a matrix of extrapolymer substances (Jumps et al., 2013). Microbial communities multicellular can be found in many (even though extreme) environments in the world. Yeast cells can form various structures when adhered to solid surfaces when grown in liquid / air interface or interact with each other when in a liquid environment and form agglomerates. Each of these structures has a level of internal cell organization and complexity connected with the formation of differentiated cell subpopulations and also have a significant environmental impact resistance (Sto'vıcek et al., 2012).

Candida lipolytica is a dimorphic ascomycete fungus that displays growth biofilm mode. Biofilm formation is an essential process for various yeasts as part of the ecological cycle. Many yeasts are prevalent in the oceans and seas polluted with oil and

oil products. Biofilms are more tolerant yeast toxicity of planktonic hydrocarbons. This yeast has been little studied with respect to biofilm formation under toxic stress conditions by exposure to oil and oil derivatives (Dusane et al.,2008). As stated in previous works, these studies may be relevant with respect to: (i) the behavior of the dimorphic yeast; (ii) environmental applications (Bankar et al., 2009).

The *ex-situ* bioremediation of seawater biofilm improved by using batch type bioreactor and agitated for bioaugmentation oxygen provided by compressed air tank filtrate has great potential as an environmentally friendly and cost-effective technology. This paper proposes the application of this technology to investigate the biodegradation of diesel oil in seawater by *Candida lipolytica* UCP 0988 and the influence of dimorphism phenomena, chemotropism and biofilm formation on improving the biodegradation process.

2. Material and Methods

2.1. Micro-organism and preservation culture medium

Candida lipolytica UCP 0988 was transferred from the Culture Collection of the Nucleus of Research for Environmental Sciences and Biotechnology of the Catholic University of Pernambuco (Brazil), registered with the Data World Center Database for Micro-organisms of the World Federation for Culture Collection under No WDCM 492. The yeasts were maintained at 4°C in test tubes with YMA medium (Yeast Mold Agar) inclined, with the following composition: 3 g / L yeast extract, 3 g / L malt extract 10 g / L D-glucose, 5 g / L and tryptone 15 g / L agar. The pH was adjusted to 5.0 with HCl. Transfers to agar plates were made monthly to ensure cell viability.

2.2 Diesel oil

Type B7 (7% biodiesel, 93% diesel) - obtained in gas fuel Petrobras, located in the metropolitan area of Recife, Pernambuco, presenting in its composition paraffinic hydrocarbons, naphthenic and aromatic (10-40%), maximum 0.05 % sulfur, nitrogen compounds, and impurity oxygen compounds and additives.

2.3 Collection and physicochemical characterization of seawater

The sea water was collected in Beach Port Complex of Suape, Pernambuco, Brazil.

2.4. Process diesel biodegradation

The biodegradation process was carried out for 69 days in 5-liters glass reactor (BioFlo 2000 News Brunswick) with a volume of 4 liters containing 70% (v / v) Sea water with pH adjusted to 5.3 and 30% (v / v) diesel B7. The sea water used in the experiments has been previously sterilized by autoclaving at 121°C for 30 minutes and diesel oil flowing steam for 15 minutes (Albuquerque et al., 2006; Nobrega et al., 2016). The bioreactor was inoculated aseptically with 0.636 g of *Candida lipolytica* UCP 0988 cells grown on YMB medium at 28 °C for 72 h. The temperature and the aeration rate and agitation of the bioreactor was controlled at respectively 28°C, 0.875 vvm and 300 rpm, according to Nobrega et al., (2016). The pH and dissolved oxygen were not controlled. Samples were collected aseptically with 0h, 24h, 1176h and 1656h for: determinations of cell viability, pH, salinity, specific gravity and emulsification activity, optical and Scanning Electron Microscopic (SEM) analysis and Gas Chromatography Analysis using Flame Ionization Detector and Mass Spectrometer (GC-DIC/MS).

2.5. Analysis of cell viability, pH, salinity and emulsifying activity

The microbial quantification was performed using pour plate technique according to the methodology of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA 1998). The results were expressed as Colony Forming Units per mL (CFU / mL). The pH was measured potentiometrically and salinity and specific gravity by refractometry. The emulsifying activity of the cell-free culture was determined according to the method described by Cirigliano and Carman, (1984). The method defines an emulsification unit and the amount of emulsifier to produce an emulsion having absorbance of 1.0 at 540 nm, that is, the amount of emulsifier able to raise the absorbance of the system into one unit.

2.6. Dimorphic transition analysis by Scanning Electron Microscopy

The dimorphic transition of *Candida lipolytica* UCP 0988 was tested in sea water contaminated with diesel. The analysis of cell morphology was performed using a scanning electron microscope (JSM-T2000 model, brand JEOL, Tokyo, Japan).

2.7. Macroscopic monitoring of chemotropism and biofilm formation

The chemotropism and macroscopic biofilm formation by *Candida lipolytica* UCP 0988 on the glass surfaces of the bioreactor were recorded using digital camera of 15 megapixel mobile phone Samsung J7 model.

2.8. Extraction of biofilm

A universal protocol for extracellular polysaccharide extraction of biofilm matrix does not exist. In this study usual extraction procedures were adapted to the specific nature of the biofilm and polysaccharide studied.

2.9. Biofilm formation analysis by Scanning Electron Microscopy

The biofilm samples *Candida lipolytica* UCP 0988 were prepared for microscopic analysis according to the protocol described by De Souza (1998). Samples were washed twice for 2 minutes in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 and fixed with 2.5% glutaraldehyde - in 0.1M phosphate buffer - pH 7.4, for 1 hour, at room temperature.

After the fixing step, the samples were washed again with phosphate buffer twice for 10 minutes. The following was performed to post-fixation step with 1% osmium tetroxide in phosphate buffer for 1 hour at room temperature under dark conditions. Samples were again washed with phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹ being subjected to dehydration process.

In the dehydration step of the samples was used ethanol in proportions of 50%, 70% and 90% (5 minutes for each exchange) until the ratio of 100% (three times, 10 minutes each exchange).

After this step, the samples were subjected to critical point for complete elimination of the liquid phase and mounting brackets and aluminum metallized with gold. The thus prepared samples were viewed, analyzed and photographed in a scanning electron microscope (JSM-T2000 model, brand JEOL, Tokyo, Japan).

2.10. Identification of diesel fuel oil

For each collected sample, a aliquot of 15 ml of cell-free metabolic liquid was extracted with 15 ml of n-hexane (solvent). The n-hexane phase (residual oil) was collected into vials, and the extract was dried with 10g Na₂SO₄. The extract was filtered through glass funnel using Whatman filter paper No. 4 and then subjected to a new

filtration using Millipore 0.22 μM membrane to remove any residues and to ensure the purity of the sample.

One microliter of the organic phase was analyzed by Gas Chromatography with Mass Spectrometer (GC / MS) using a Flame Ionization Detector (FID). The analysis of the aliphatic fraction of diesel hydrocarbons comprising the C9 to C21 range was conducted using a gas chromatograph analytical type (Agilent Technology 7890); equipped with a split-less injection split column (splitter (100: 1).), a flame ionization detector and capillary column DB-5ms (30m long x 250 μM internal diameter x 0.25 mm thick) The helium was used as carrier gas with a flow rate of 1 ml / min. The initial oven temperature was fixed at 40°C for 1 minute and then programmed to increase 4°C per minute to 290°C, holding for 8 minutes. The flow rates of air, nitrogen and hydrogen were respectively equal to 400, 25 to 30 ml / min. The temperatures of the injector and detector was equal to 290°C. Areas of the most significant peaks of the chromatograms were automatically calculated and the peaks were integrated considering the heights. individual compounds were identified by mass spectrometry using electron impact ionization system. All analyzes were performed in triplicate.

3. Results and Discussion

Chemical physical analisys of seawater

The sea water collected at the Suape Port complex had the following composition: 1.00 ‰ Ca⁺⁺; Mg⁺⁺ 0.97 ‰; 11.13 ‰ Na⁺, K⁺ 0.88 ‰, Cl⁻ 20.50 ‰, SO₄⁻3.41 ‰. The salinity, specific gravity, surface tension and pH were equal to 35 ‰; 1027 kg/m³, 7.66 and 70.3 mN /m, respectively.

Analysis of cell growth, pH, salinity and emulsifying activity

The yeast *Candida lipolytica* UCP 0988 showed an ability to degrade diesel B7 10% (v / v) in sea water as the sole source of carbon and energy, without prior acclimatization and supplementation of nitrogen and phosphorus sources. The kinetic profiles growth, salinity, specific gravity, pH, and emulsifying activity for emulsion of water in corn oil and water in diesel oil obtained biodegradation in 69 days, are shown in Figure 1.

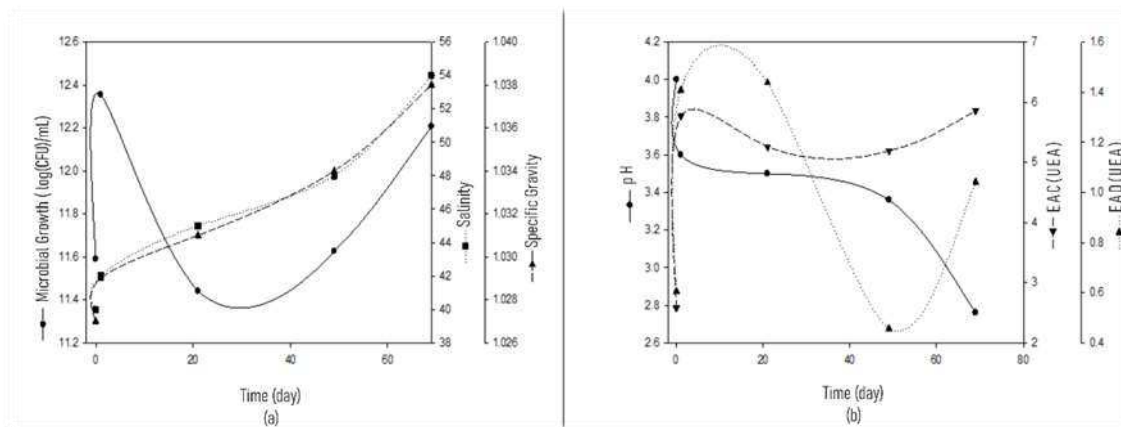


Figure 1. Profiles of (a) microbial growth, salinity and specific gravity and (b) emulsifying pH and water activity emulsion water-in-corn oil (WICO) and water-in- diesel oil (WIDO) of *C. lipolytica* UCP 0988 in 10% diesel biodegradation process in seawater.

The growth profile presented diauxic behavior can be divided into three phases: two growth, separated by a decline.

The first phase lasted approximately 24 hours, with maximum growth rate of 0.0319 h^{-1} , and doubling time 21.76 hours ($d 0.91$) and was followed by a growth phase with a decline maximum speed of 0.002 h^{-1} and timing means declining 363.96 hours (15.17 d), which lasted about 30 days. The third phase lasted approximately 38 days, with a maximum growth rate 0.0007 h^{-1} and doubling time of 1042.82 h (43.45 d). The increase of cell growth after the decline phase of free cells was probably improved by

the incorporation into the medium of mature sessile cells (from 17 to 25 days of growth) that have broken off the glass walls and the stainless steel cover of the bioreactor, leading to increase the biodegradation of diesel due to the increased contact surface with hydrophobic compounds.

The behavior of the diauxic *C.lipolytica* UCP 0988 confirms growth curve results obtained by Nobrega et al. (2016), suggesting that the underground diesel B7 is metabolized sequentially, with the constituents of biodiesel priority use as substrate for yeast compared to petroleum diesel hydrocarbons. The presence of 7% biodiesel may have led to repression of enzymes for the metabolism of diesel constituents. So only when the biodiesel concentration was reduced by the consumption by the yeast, enzymes required for the metabolism of diesel could be elaborated.

The results in Figure 1 show that water in corn oil emulsification activities (WICO) and water in diesel oil (WIDO) were directly associated with growth kinetics, suggesting the production of emulsifying agents with different specificities for yeast. Hassanshahian et al. (2012) and Zinjarde and Pant (2002) reported the production of emulsifiers associated with growth during biodegradation of alkanes of different varieties of *Y. lipolytica* and that the acid pH was better than neutral for hydrocarbon biodegradation.

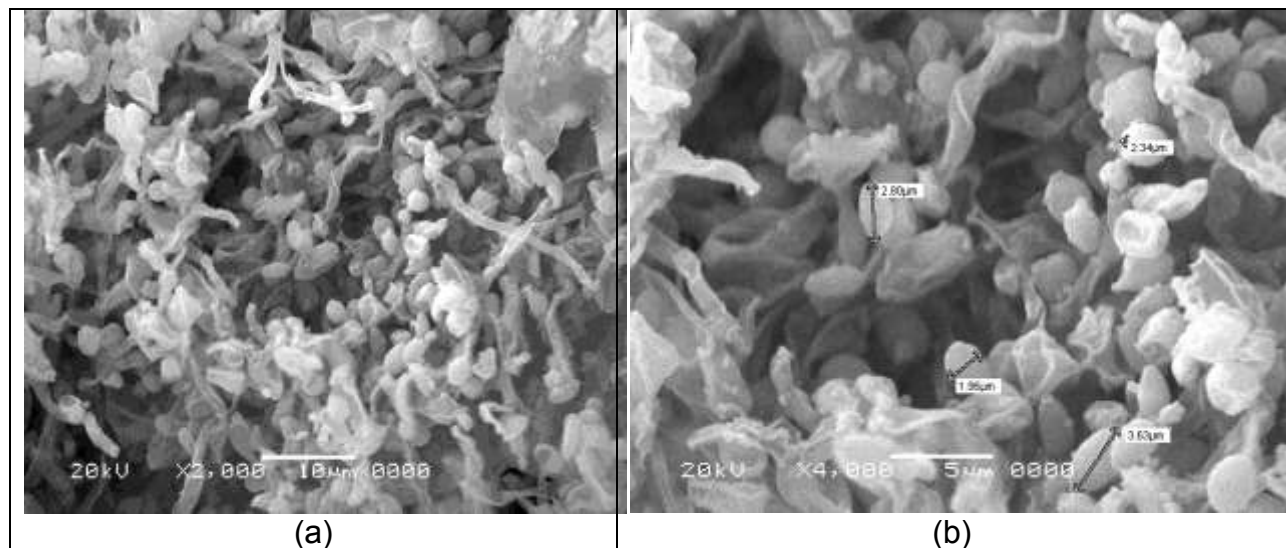
The salinity and specific gravity increased continuously throughout the process. The salinity ranged from 4.0 to 5.4%, confirming the halotolerant behavior of *C. lipolytica* UCP 0988, previously observed by Nobrega et al. (2016), who described the effects of varying salinity on the hydrocarbonoclastic activity of this yeast in the seawater. Whereas the salinity in marine environments is 3-3.5%, Wang et al. (2015) conducted an experiment with synthetic sea water with salinity of 3.38% to compare the

effect of bioremediation immobilized bacteria with bacteria free. The study showed a good performance of degrading oil in salinity of 0.5%, but the metabolic activity of degrading most of the oil was inhibited when the salinity increased to 3.5% (Li et al., 2008; Mukherji et al., 2004)

The pH reduction process can be attributed to the formation of organic acids resulting from biodegradation of hydrocarbons and production of extracellular polymers (Cerqueira et al., 2011; Verma et al., 2006).

Dimorphic transition Analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM)

In Figure 2 are shown scanning electron micrographs of samples of cell-free diesel oil biodegradation process in seawater B7 by the UCP 0988 *C.lipolytica* obtained with 1 (Fig. 2a and 2b) and 21 days (Fig. 2c and 2d).



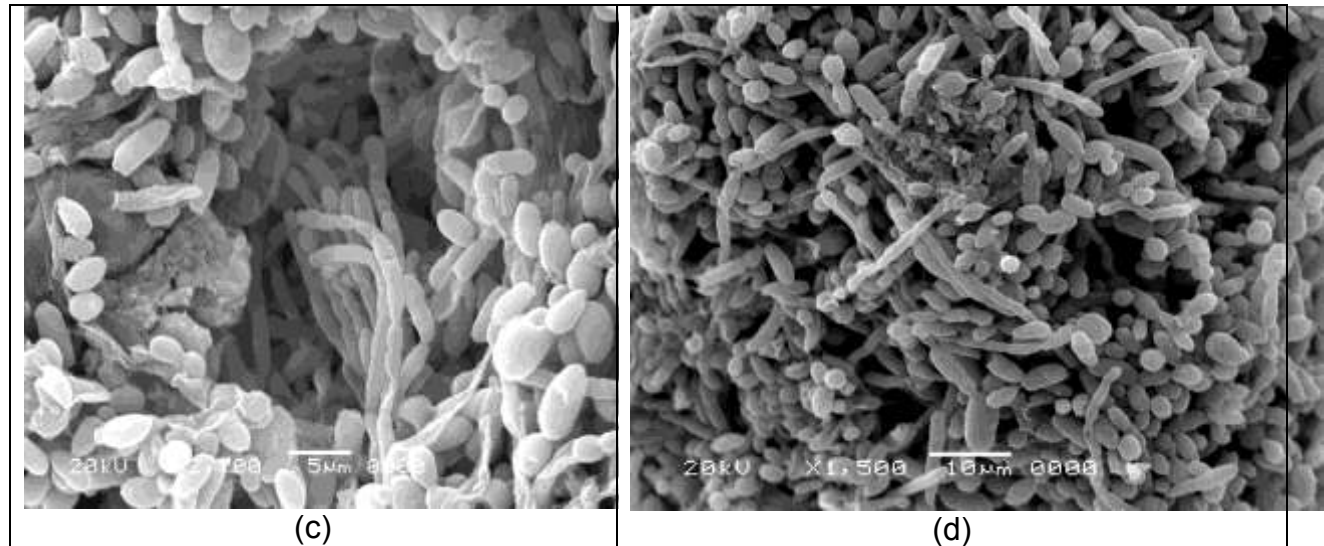


Figure 2. Representative scanning electronic photomicrographs of hyphal mycelia transition of *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater contaminated with 20% (v / v) diesel B7, pH 3, incubated at 28 ° C (a - b) 24 h (c-d) at 21 days.

After 24 hours, the yeast form is predominant, but budding cells, formation of germ tubes, pseudo hyphae, hyphae and excretion exopolysaccharides can be observed (Fig. 2a).

The dimensions of some yeast cells were measured and are shown in Figure 2b. The dimensions are compatible with those observed for Palande et al. (2014), in a study dimorphism and on Marine yeast metabolism *Yarrowia lipolytica* var. *indica*. In this study, the first of the biodegradation process, the yeast actively grown in the presence of hydrocarbons, as evidenced by observation of cells with budding, early cell transition in yeast format for pseudohyphae, and hyphae and excretion of Extracellular Polymeric Substances (EPS - Extracellular Polimeric Substances). The EPS of excretion of the microbial cell surface is usually considered as a harmful and response to stressful environmental conditions (Brand; Gow 2012).

At 21 days growth continued extremely active free cells in the presence of

hydrocarbons having significant EPS production (Fig. 2c) and micelle formation (Fig. 2d). In a previous study with isolated marine *Yarrowia lipolytica* NCIM 3598, Zinjarde et al. (2008) showed that the yeast medium was predominant during the degradation of alkanes, while the mycelial form was favored in partially anaerobic conditions. According to these authors, the mycelium formation can be significant for fungi, in terms of providing a better opportunity to collect nutrients available the marine environment. With saturated alkanes exists a reverse transition, implying that the yeast form is preferred over the use of such substrates. In contrast to the results obtained in this study Palande et al. (2014) found no dimorphism in *Y. lipolytica* var *indica* by seawater use when used glycerol as a carbon source in seawater under aerobic conditions. According to these authors, at pH 3, the yeast cells were predominant and no mycelial growth was observed. In the present work, among likely effectors involved in the dimorphic transition *C.lipolytica* UCP 0988 may be cited: the high concentration of diesel oil, the limitation of nitrogen and acidification of the seawater.

Chemotropism and biofilm formation

In Fig 3 are shown pictures chemotropism and biofilm formation on surfaces of glass and stainless steel bioreactor in diesel oil biodegradation process B7 *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater.

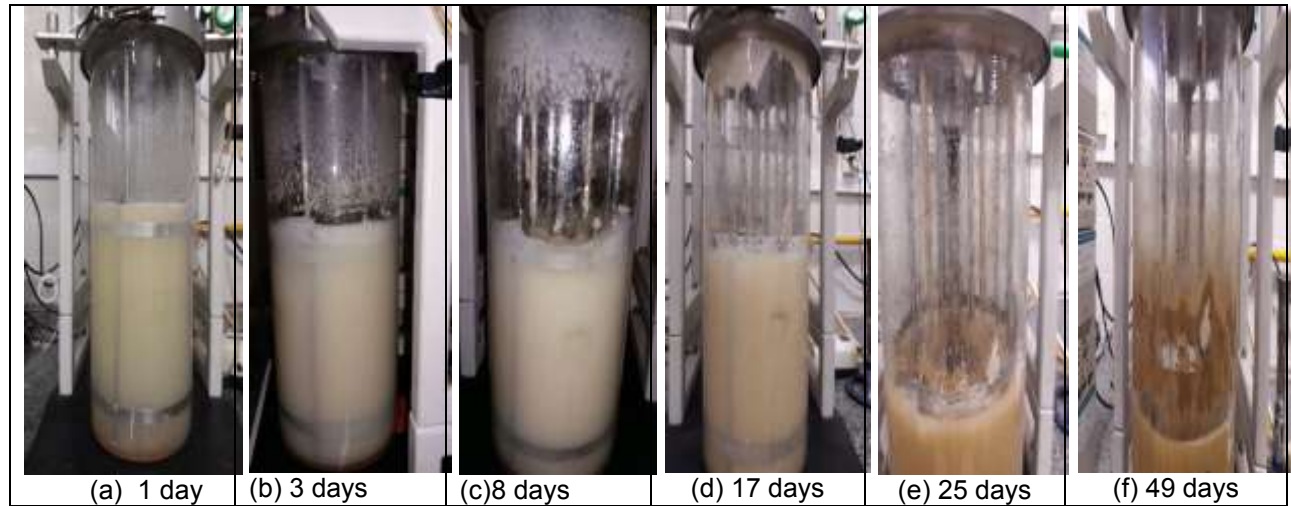


Figure 3. Chemotropism and different stages of biofilm on surfaces of glass and stainless steel forming bioreactor diesel oil biodegradation process B7 *Candida lipolytica* UCP 0988 in sea water: (a) 1 day (b) 3 days (c) 8 days (d) 17 days (e) 25 days and (f) 49 days.

In the first 24 hours of the process, exponential growth of *C. lipolytica* UCP 0988 cells was accompanied by intense production and condensation of vapors. The initial adhesion *C. lipolytica* UCP 0988 cell-free surfaces of glass and stainless steel bioreactor occur randomly as a result of agitation and aeration of the liquid medium (Fig. 3a). After the initial adhesion the cells were able to coordinate cell cycle, growth and expansion of its boundaries with directional growth responses. The cell *C. lipolytica* UCP 0988 developed a specific sensing system and response mechanisms to regulate their directional growth (tropism) on the surfaces of glass and stainless steel bioreactor. The exchange of environmental stimuli is extremely accurate and the response of cells involves the integration of mechanical, chemical and electrical stimuli. The mobility of *C. lipolytica* UCP 0988 cells over the glass surface bioreactor suggests the occurrence of a chemotropic movement away the liquid medium - hypersaline acid, aromatic and aliphatic hydrocarbons containing long chain and an increasing population of planktonic cells - towards the upper region of bioreactor with a high concentration of short chain

volatile hydrocarbon vapors and water. With three days, the cells chemotropism is visible to the naked eye (Fig 3b).

According to the literature (Brand; Gow, 2009, Brand; Gow 2012), the chemotropism of ascomycetes and basidiomycetes have been hard to find. The exception is reported very strong response to sex pheromones view of gametes to all major classes of fungi. The hyphae tropic alignment plays an important role in the growth of mycelium of fungi. The mycelium hyphae in a display reactions avoiding to each other resulting in branching evenly spaced cells to maximize placement of the substrate. The mechanism underlying this negative autotropism was hypothesized to be mediated by aerotropism relative to oxygen (away from impoverished areas with oxygen around metabolically active hyphae) or negative chemotropism (away from the storage products) but the evidence of both remains elusive. The hyphae may also be fused with each other, end to end or tip of the hyphae. According to Daniels et al. (2006) it is possible that biofilm formation and stabilize such arrays facilitates chemotropic directions.

At eight days, the directional growth of the cells was reduced, stabilized. The stainless steel cover of the bioreactor served as physical limit for the chemotropic movement, favoring the formation of biofilm on its bottom side and the upper surface of the glass bioreactor adjacent to it (Fig. 3c).

Between the eighth and the seventeenth day can be observed stable cell adhesion, colony formation and the beginning of biofilm maturation phase with an intense production of extracellular composed entirely covering the lower surface of the stainless steel cover and the surface upper side of the glass reactor. From the

seventeenth day (Fig. 3d) the thickness of the biofilm has progressively increased until rupture occurs / detachment of large parts of the mature biofilm of bioreactor surfaces with subsequent inoculation of liquid medium, between the third twentieth and twenty-fifth day the biodegradation process.

After the introduction of sessile cells in metabolic liquid was changing color - from creamy white to dark brown - the whole metabolic fluid and sessile adhered cells bioreactor glass walls, except for a set of white sessile cells (Fig. 3e). These white cells *C.lipolytica* shown to have increased resistance to environmental stress physiological, suggesting the existence of biofilms in a wide heterogeneity metabolism, physiology and gene expression. Increased secretion of EPS was essential for effective adhesion of cells and development of cream-white biofilm on the surfaces of the glass bioreactor. The increased thickness and white-cream biofilm weight contributed to its disruption / detachment surface and inoculation of the metabolism liquid, enhancing the biodegradation of hydrocarbons hydrophilic compounds. Zhang et al. (2015) proposed that the selection of micro-organisms for use in biodegradation, biofilm inoculation is taken into account (the biofilm formation is one of the criteria to be used in the selection) as improvement factor of microbial activity and removal HPA.

From the twenty-fifth day they were observed the development of new cycles and chemotropic dark brown sessile cells of biofilm formation on glass surfaces and the central support the stainless steel bioreactor (Fig. 3f). The concentration of sessile and planktonic dark brown cells continuously increased to the sixty ninth day, when the process was discontinued and samples were collected from white and brown cell-free and sessile, for chromatographic and microscopic analysis.

The formation of biofilm on stainless steel surfaces of the center support and the bioreactor of the cover and the glass surfaces around the central and surrounding support reactor lid make clear that volatile compounds were used as a carbon source to support cell growth sessile white and dark brown of biofilms. This is significant since there was used diesel oil as the sole source of carbon and energy by *C. lipolytica* UCP 0988 and the growth of sessile cells was comparable to that of cell free soluble hydrocarbons used in seawater.

In Figure 4a can be seen the three dimensional structure of mature biofilm with 21 days prior to the deployment of the glass wall of the bioreactor. The biofilm presents a dense, multi-layered structure. It can be observed that *C. lipolytica* UCP 0988 biofilm has about 32.4 mm thick. The cell-free sample analyzed in Fig. 4b metabolic liquid was obtained 21 days, inoculated with biofilm already detached from the glass surfaces of the bioreactor. Biofilm architecture features a wide heterogeneity in distribution of cells and extracellular material. The EPS matrix interconnects cells in an intricate network - involving blastospores, pseudo hyphae, hyphae and mycelium - compatible with 21-day biodegradation. SEM analysis of the sample sessile cells allows observation in detail, waterways and the microencapsulation yeast cells in the arrays EPS.

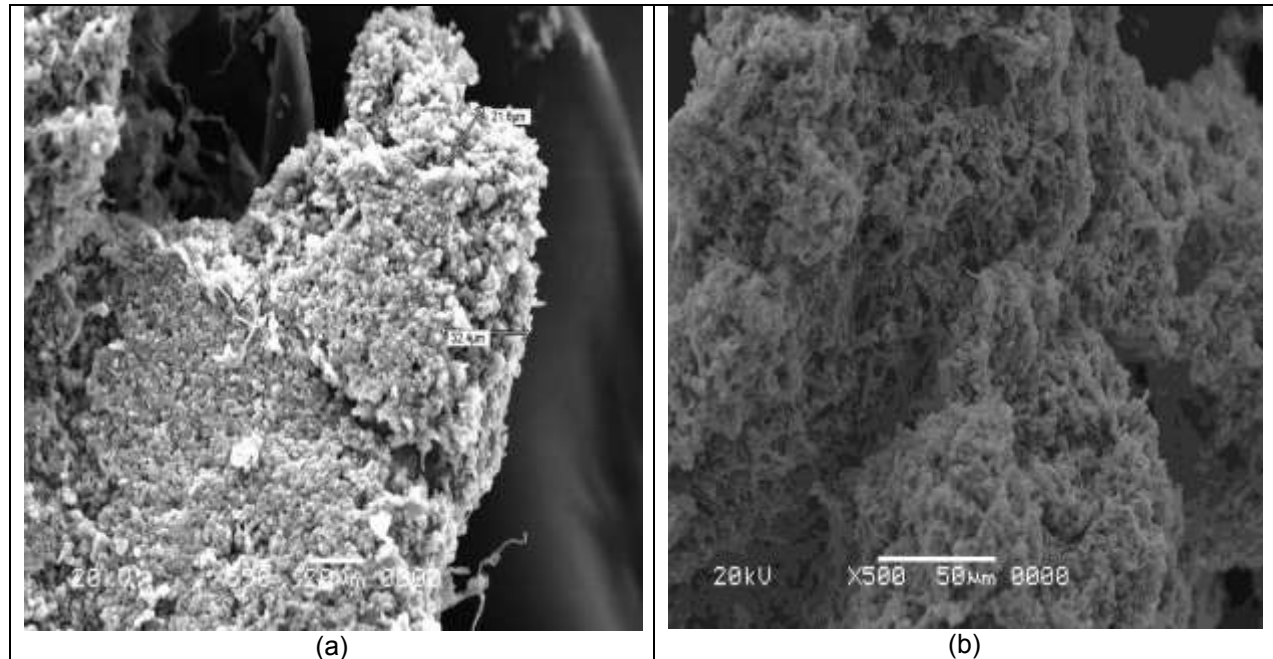


Figure 4. Scanning Electron micrograph of three dimensional structure of biofilm formed on the glass surface bioreactor during the process of diesel biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater free cells and 21 days inoculated with biofilm metabolic liquid surfaces highlighted of glass.

The matrix structure forms the elastic part of the biofilm. Interstitial channels and spaces that separate microcolonies containing a liquid phase consisting primarily of water which can be visually observed in Fig. 3e. This viscous liquid phase is the part of the biofilm. The EPS matrix provides mechanical stability to the biofilm through these viscoelastic properties. All major classes of macromolecules, i.e. polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipids and peptidoglycan can be present in a biofilm. Although the extracellular polysaccharides are considered the main structural components of the biofilm matrix, extracellular DNA plays an important role in the establishment of biofilm structure (Flemming; Windgenger, 2010). There is no simple method to study the structure and dynamics of microbial biofilms, only the combination of different methods, methods classified as dependent cultures and methods of independent cultures,

EPS analysis presents several difficulties and composition greatly varies with factors such as microorganisms, experimental hydrodynamics, availability and composition, temperature, etc. Additionally, the role and properties of the individual components of the extracellular matrix is still poorly understood (Rock, 2016).

Biodegradation of diesel improved by biofilm formation

To analyze the role of biofilms in improving diesel oil B7 process of biodegradation of 10% (v / v) in sea water by *C.lipolytica* UCP 0988, its formation was monitored by photographic records (Fig.5a, d, g and m) for optical microscopy (Fig. 5b) and by SEM (Fig. 5e, h, i, j, n, o and p). B7 diesel oil biodegradation process was monitored by GC-FID / MS (Fig. 5c, l and q). As the process was performed in glass bioreactor, macroscopic changes such as color changes, viscosity and increasing the number of cells (turbidity) could also be accompanied by visual inspection (Figures 5a, d, g and m).

In Figure 5a the bioreactor can be seen - before beginning the process of biodegradation (0h) - diesel oil containing a B7 layer covering the sea water, with cells inoculated *C.lipolytica* UCP 0988 (Fig 5a). Photomicrographs of the yeast cells used in the inoculation are shown in Fig. 5b. The density of the initial inoculum was an important factor for the growth of yeast, for the diesel fuel degradation and the development of thigmotropism, dimorphism and biofilm formation. An initial seeding density of 1×10^5 CFU / ml EPS matrix produced with robust structures during the course of biofilm formation and diesel oil biodegradation. This inoculum density and the results obtained are consistent with results reported by Singh et al. (2011). Figure 5c shows the chromatogram of B7 diesel oil components prior to biodegradation. Only alkane fraction

of diesel and biodiesel methyl esters were determined. 13 open-chain alkanes were identified (alkanes nonane-C₉H₂₀ the octadecane-C₁₈H₃₈, eicosane-C₂₀H₄₂, heneicosano-C₂₁H₄₄ and tetradecane-C₂₄H₅₀), one branched chain alkane (nonadecane, 2-methyl-C₂₀H₄₂), 2 alkanes, isoprenoids (pristane - and phytane C₁₉H₄₀ - C₂₀H₄₂) and 4 methyl esters of fatty acid (palmitic acid methyl ester, C₁₆: 0, stearic acid, methyl ester, C₁₈: 0, oleic acid, methyl ester -C₁₈: 1 (4) and the acid linoleic -C₁₈ methyl ester: 2 (9,12)).

Figure 5d shows the exponential growth of planktonic cells during the first hours of the process - revealed by increased turbidity (intense white-cream color) and viscosity of the liquid metabolic - and evaporation / condensation of volatile compounds in the reactor (sealed). The scanning electron micrograph (Fig. 5e) shows the standard yeast-mycelium transition occurred on the first day after inoculation *C.lipolytica* UCP 0988 in sea water containing diesel oil, at acid pH. The significant production of extracellular material can be viewed. Fig. 5f shows the chromatogram of diesel B7 residual sample after 24 hours of biodegradation by the UCP 0988 *C.lipolytica* yeast.

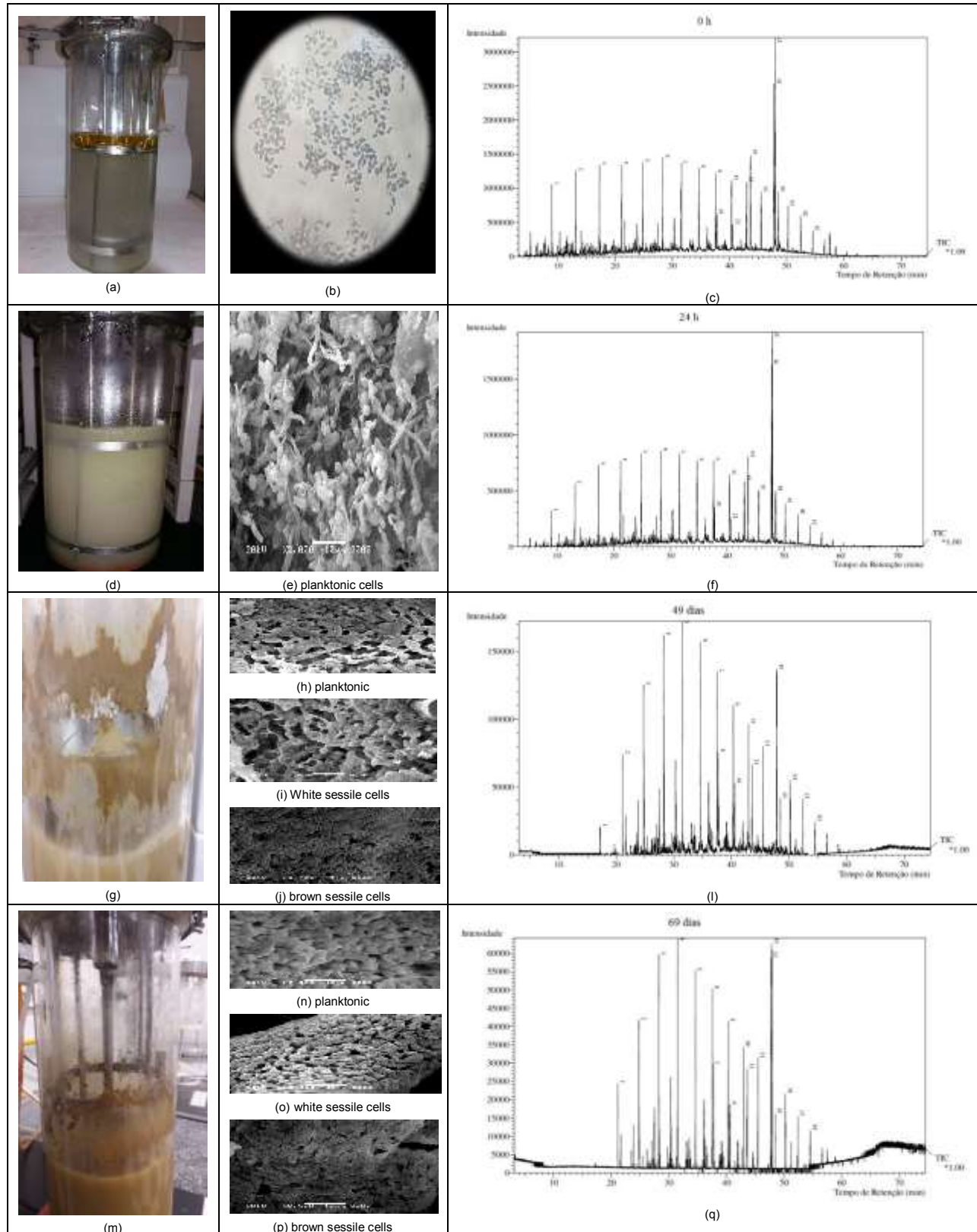


Figure 5. Biodegradation 10% of diesel oil in sea water by *C. lipolytica* UCP 0988 Bioreactor: photographs (a, d, g, m), scan eletromyochrography (b, e, h-i-j , n-o-p) chromatograms and (c, f, l, q).

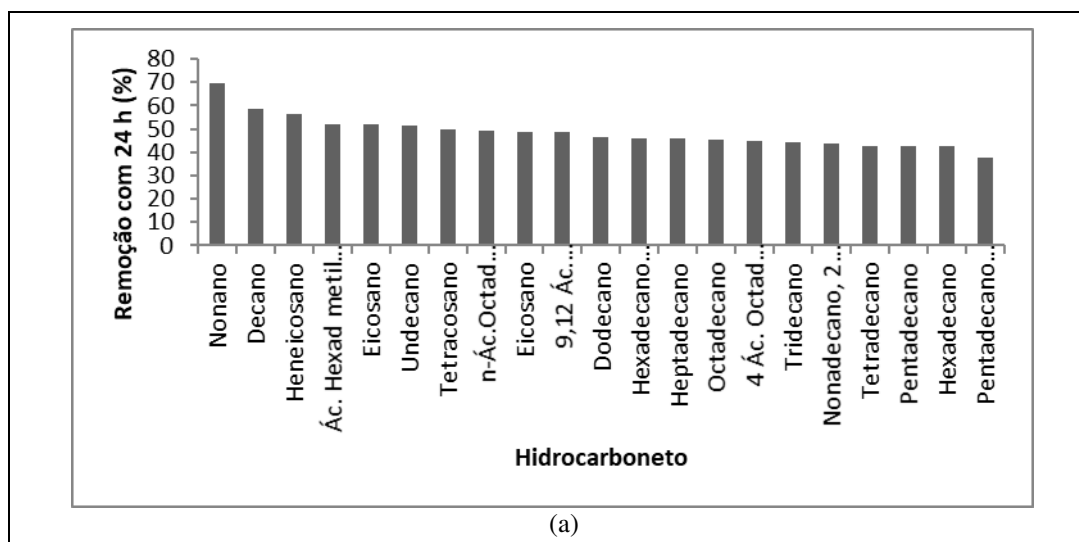
The results indicate the occurrence of reduction of 47.95% (percent removal) in the total area of the peaks at 24 hours with a total area of the peaks at the start of the process (Fig. 5c).

On the twenty-fifth day of the process was observed a sudden change of color - from creamy white to brown - metabolic fluid and biofilm formed on the surfaces of glass and stainless steel bioreactor, probably due to hydrocarbon biodegradation. However, some areas of the biofilm growing on the glass surface and the central support stainless steel bioreactor, kept white by the end of the process, when they were collected for analysis. These color changes may be observed in Figs. 5g and 5m.

The micrographs scan cell-free samples (submerged sessile cells in the metabolic liquid), sessile white and sessile brown obtained at 49 days (Figs. 5 g, h, i) and 69 days (5 n, o, p), disclose structured communities of encapsulated yeast material matrix extracellular polymeric. The apparent similarity of the images can be justified by the fact that large amount of biofilm have highlighted the surfaces of glass and stainless steel bioreactor and inoculated metabolic liquid, which initially found only planktonic cells. The main differences observed in the images are associated with the compression and extension of the surface of the matrix and the EPS microencapsulation of yeast cells as a function of biofilm maturation time. Other important differences between the samples are analyzed the elasticity / stiffness of the matrix and the amount of spaces and interstitials channels separating the microcolonies. Biofilms from metabolic liquid sample have greater elasticity and greater number of channels and interstitials voids white and brown biofilms. Regarding the biofilm white, brown biofilm showed higher stiffness and fewer interstitials voids and channels.

The chromatograms of the residual oil with 49 h (Fig. 5 l) and 69 h (Fig. 5 q) biodegradation of occurrences indicate reductions - in relation to the total peak area at time 0 (Figure 5 c) - of respectively 94.63% and 97.72% (percentage removal). The results of GC-FID / MS analysis (Figure 5 c, f, l and q) confirm the ability of the *C.lipolytica* UCP 0988 yeast degrade diesel B7 in natural seawater, without prior acclimatization and supplementation of nutrients such as nitrogen and phosphorus.

The graphics diesel B7 oil removal percentage of 24, 49 and 69 days showed in Fig. 6 allow us to observe the effect of time during aliphatic hydrocarbon biodegradation process of petroleum diesel and methyl biodiesel esters and preferably degradation yeast certain compounds. *C.lipolytica* UCP 0988 clearly showed a pattern of selective degradation, degrading compounds - without major changes over time in selectivity compared to established criteria - basically in the order specified below: short chain alkanes and unbranched, methyl esters short-chain unbranched, an intermediary chain alkanes, branched long-chain alkanes and finally isoprenoid alkanes.



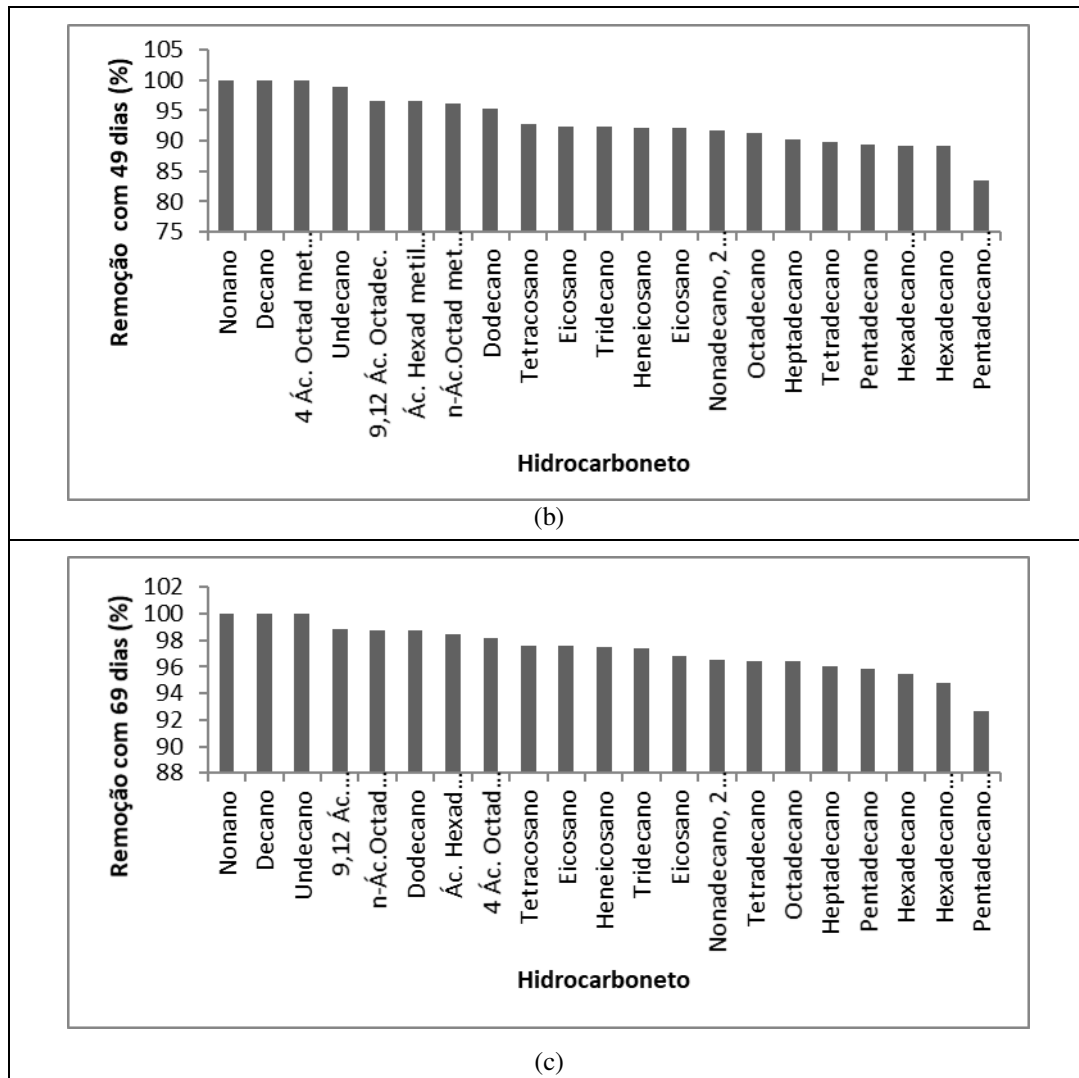


Figure 6. Percentage of diesel hydrocarbon removal B7 (7% biodiesel 93% petroleum diesel) by *C. lipolytica* UCP 0988 in seawater after (a) 24 h, (b) 49 days and (c) by 69 days.

In Figure 6 it can be seen that increasing the incubation time favored the increase of diesel biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988. Within 24 hours, the average percentage of biodegradation of the compounds examined was equal to 48.55% with individual percentages range being 37, 61 and 69.79%. With 49 days, the average percentage of biodegradation was equal to 93.31%, with percentages varying individual being 83, 51 and 100%. Finally, with 69 days, the average percentage of biodegradation was equal to 97.32% with 92.61 individual percentages varying and being 100%.

Palanisamy et al. (2014) obtained on 5 days optimum biodegradation of 99% of diesel oil, mineral medium in saline, using bacterial monoculture *Acinetobacter baumannii* at pH 7, 35 ° C and an initial hydrocarbon concentration of 4%. Nkem et al (2016) tested the ability of diesel oil degradation by bacteria *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 in minimum mineral medium, initial pH 7.5, 32°C for 10 days. *C.cellulans* deteriorated on average 64.4% of alkanes and *A. baumannii*, 58.1%.

Several studies describe the capacity for degrading microbial consortia hydrocarbon diesel fuel at different operating conditions and process time. Experiment carried out for 50 days with the bacterial consortium, the percent degradation of diesel oil 90%. On the other hand, the experiment conducted with fungal consortia for 64 days, the percent of hydrocarbon degradation of 41.3%.

The diesel isoprenoids have slow degradation and is more stable than the straight chain alkanes. The ratio of n-C18 / n-C17 and phytane / pristane has been used as biomarkers for estimating the internal microbial degradation of linear alkanes and to evaluate the short term degradation of hydrocarbons (Ortiz et al., 2003). The reduction of this index indicates a greater oil biodegradation. The relationship pristane / phytane has also been used as internal biomarker. The relationship pristane / phytane almost constant indicates that pristane and phytane are good conservative internal markers for diesel oil. Table 1 shows the relationship C17/pristane and C18/pristane and phytane/ phytane obtained with 0.49 and 69 days as the contaminant biodegradation rates and corroborate the results obtained.

Table 1 - Relationship between Heptane, pristane, octadecane and phytane during diesel oil biodegradation process in seawater by *C.lipolytica* UCP 0988 biofilm improved by the yeast.

Hydrocarbon compound	Formula	0h	1 day	49 days	69 days
Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	4079447	2207975	312 527	79,049
2,6,10,14 Pentadecane (Pristane)	C ₁₉ H ₄₀	1706609	1064761	163336	109754
Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	3559319	1947149	261 909	79,220
2,6,10,14 Hexadecane (Phytane)	C ₂₀ H ₄₂	1508550	812 190	170964	91,441
Phytane / Pristane Ratio	Fit/Pri	1.1312910	1.31097526	0.955382	1.200271
Heptadecane / Pristane Ratio	C ₁₇ /Pri	2.3903817	2.07368132	1.913399	0.720238
Octadecane / Phytane Ratio	C ₁₈ /Phy	2.3594305	2.39740577	1.531954	0.866351

The GC-MS analysis suggests that *C.lipolytica* UCP 0988 degrade almost all the aliphatic hydrocarbons present in the diesel fraction, including pristane and phytane isopropenoids compounds. Therefore, *C.lipolytica* UCP 0988 can be considered as a suitable agent for recovery of degraded areas for diesel and other oil derivatives.

The biostimulation with only aeration of natural seawater, without the addition of nitrogen and phosphorus, improved biodegradation of hydrocarbons analyzed. Biodegradation improved hydrocarbons by pure culture of biofilm can be a cost effective strategy for bioremediation *ex situ*, in the middle and / or large-scale seawater contaminated by diesel fuel oil and, given that extracellular polymers biosurfactant and enzymes are produced by the yeast and the costs of the culture medium (natural seawater) and biostimulation (filtered air) are low.

5. Conclusion

The phenomena of dimorphism, chemotropism and biofilm formation contribute to the improvement of the B7 diesel oil biodegradation in seawater. Bioreactor batch stirred tank equipped with aeration systems, agitation and appropriate temperature control can be used as physical models for simulating the bioremediation of water contaminated sea by petroleum hydrocarbons and the methyl esters of biodiesel and

study of phenomena such dimorphism chemotropism and biofilm formation, which can be induced by petroleum derivatives and biodegradation processes.

The bioremediation *ex-situ* system model of seawater contaminated with B7 diesel oil having *C.lipolytica* UCP 0988 as bioremediation agent and seawater as mineral medium proved to be effective and can be extended and applied in *ex-situ* bioremediation of the seawater contaminated with petroleum hydrocarbons and derivatives.

6. Acknowledgments

To the Federal Institute of Alagoas for financial support and the Catholic University Pernambuco for the use of the facilities of the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB).

7. References

- Albuquerque, C. D .C; Fileti, MFA; Campos-Takaki, GM, 2006. Optmizing components in the medium bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. Can. J. Microbiol. 6, 575-583.
- APHA - American Public Health Association (1992), Standard Methods for Water and Wastewater, 18th ed.
- Bankar, AV; Kumar, AR; Zinjarde, SS, 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. App. Microbiol. Biotech. 84, 847-865.
- Brand, A., Gow, NAR, 2012. Responses Tropic orientation of Pathogenic Fungi. In: Martin Perez-J, Di Pietro (eds) Morphogenetic and Pathogenicity in Fungi. Topics in Currents Genetics 22. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.21-41.
- Brand, A., Gow, NAR, 2009. Mechanisms of hypha orientation of fungi. Curr Opin Microbiol. 12, 350-357.
- Cerqueira, VS, Hollenbach, EB Maboni, F., Vainstein, MH, Camargo, FAO, Peralba, MCR, Benedict, FM, 2011. Biodegradation potential of oily sludge and mixed by pure bacterial cultures. Bioresour. Technol. 102, 11003-11010.

Cirigliano, MC; Carman, GM, 1984. Isolation of the bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *App. And Environ. Microbiol.* 48, 747-750.

Daniels KJ Srikantha T Lockhart SR, Pajol C DR Soll, 2006. Cell Signal-Opaque white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *European Molecular Biology Organization Journal EMBO J.* 25, 2240-2252.

De Souza, W., 1998. Basic techniques of electron microscopy applied to biological sciences. Ed. Brazilian Microscopy Society, Rio de Janeiro, 156p.

Dusane DH., Nancharaiah, YV., Venugopalan, VP., Kumar AR, Zinjarde, SS., 2008. Biofilm formation by the biotechnologically important tropical marine isolate yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Water Sci Technol.* 58, 1221-9.

Flemming, HC, Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol* 8, 623-633.

Hassanshahian, M. Tebyan H, Cappello, S. 2012. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, .. from the Persian Gulf Marine Pollution Bulletin 64, 1386-1391.

Jumps, M. Julian A. Wharton, JA, Yves Blache, Y2 Keith R. Stokes, KR, Jean-Francois Briand, JF. , 2013. Marine artificial biofilms on surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879-2893.

Li, YQ, Liu, HF, Tuan, ZL, Zhu H, Wu, YH, Tang, HQ, 2008. Diesel pollution biodegradation: synergetic effect of mycobacterium filamentous and fungi. *Biomed. Environ. Sci.* 21, 181-187.

Mukherji, S., Jagadevan, S. Mohapatra G, Vijay, A., 2004. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. *Bioresour. Technol.* 95, 281-286.

Nobrega, HF, Seger, F., belt; MAB, Henriques, MLOMF, Campos-Takaki, GM, Albuquerque, CDC, 2016. Effect of salinity on diesel biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988. p. 75-79. in: *Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of beneficial and harmful Microorganisms*. Edited by A. Méndez-Villa. Brown Walker Press, Boca Raton, Florida, USA, 2016. ISBN-10: 1-62734-612-0, ISBN-13: 1-62734-612-2.

Ortiz, JE, Garcia, MJ, Rodriguez, JL, 2003. Bio markers and su utilidad en la evaluación de la del oil biodegradation. *Earth moving Industries y* 351, 41-45.

Palande AS, Kulkarni, CV, León-Ramirez, C., Campos-Góngora, E., Ruiz_Herrera, J. Desphande, MV, 2014. dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. *indicates*. *Arch. Microbiol.* 196, 545-556.

Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, NS, Chandran, P., Sudheer Khan, S., 2014. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from contaminated diesel soil. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 12.1-8.

Rock, JM, 2016. Composition and function of individual microbial biofilm matrix components: A key element to its control. *EC Chemistry* 2.2, 153-157.

Singh, R., Shivaprakash, MR, Chakrabarti, A., 2011. Biofilm formation by Zygomycetes: quantification, matrix composition and structure. *Microbiology* 157, 2611-2618.

St'ováček, V., Váchová, L., Palková, Z., the colony 2012. Yeast biofilm an orchestrated multicellular microorganism. *Communicative and Integrative Biology* 5, 203-205.

Wang, X., Wang, X., Liu, M., Bu, Y., Zhang, J., Chen, J. Zhao, J. 2015. Adsorption-synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine Pollution Bulletin* 92, 195-200.

Zhang, Y., Wang, F., Zhu, X. Zeng, J., Zhao, Q. Jiang, X., 2015. Extracellular polymeric substances govern the development of biofilm and mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons is improved biodegradation. *Bioresour. Technol* 193, 274-280.

Zinjarde, S., Kale BV, Vishwasrao, PV Kumar, AR, 2008. Morphogenetic behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. *J Microbiol Biotechnol* 18, 1522-1528.

Zinjarde, SS, Pant, A., 2002. Emulsifier from the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J. Basic Microbiol.* 42, 67-73.

Capítulo 3

CONCLUSÕES GERAIS

- Os fenômenos de dimorfismo, quimiotropismo e formação de biofilme contribuem para o melhoramento da biodegradação de óleo diesel B7 em água do mar.
- Biorreatores descontínuos de tanque agitado, equipados com sistemas de aeração, agitação e controle de temperatura adequados podem ser usados como modelos físicos para simulação de biorremediação de água do mar contaminada por hidrocarbonetos de petróleo e ésteres metílicos de biodiesel e para estudo sobre fenômenos como dimorfismo, quimiotropismo e formação de biofilmes, que podem ser induzidos por processos de biodegradação de petróleo e derivados.
- A levedura halo-ácido-tolerante *C. lipolytica* UCP 0988 apresenta potencial para utilizar biodiesel B7 a 10% como única fonte de carbono, biodegradar hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel e ésteres metílicos do biodiesel e produzir exopolissacarídeos, biossurfactantes, bioemulsificantes e enzimas em água do mar natural, sem suplementação de fontes de nitrogênio e fósforo. .
- A biodisponibilidade de hidrocarbonetos é um fator chave que afeta a eficiência de biorremediação na água do mar contaminada com óleo diesel. Bioemulsificantes e biossurfactantes aceleram a biodegradação de óleo diesel, aumentando sua biodisponibilidade.
- A combinação de bioaugmentação usando *C.lipolytica* UCP 0988 e a bioestimulação usando aeração (oxigenação) adequada é uma abordagem promissora para acelerar a biorremediação *ex-situ* em biorreatores de água do mar natural contaminada por hidrocarbonetos. Esta técnica apresenta como vantagens: impacto ambiental e custo reduzidos, uso de micro-organismo não patogênico altamente tolerante a condições ambientais extremas de salinidade e pH, facilidade de obter apoio público e suporte técnico- científico e financeiro.

