



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

Hamilton Felix Nobrega

***SCALE UP* DE PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO
DE ÓLEO DIESEL EM ÁGUA DO MAR POR *Candida*
lipolytica UCP0988**

Recife
2016

Hamilton Felix Nobrega

**SCALE UP DE PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO
DE ÓLEO DIESEL EM ÁGUA DO MAR POR *Candida
lipolytica* UCP0988**

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

Orientador: Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Recife

2016

N754s Nobrega, Hamilton Felix
Scale up de processo de biodegradação de óleo diesel em
água do mar por *Candida lipolytica* UCP0988 / Hamilton Felix
Nobrega ; orientador Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, 2016.
165 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.
Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação.
Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2016.

1. *Yarrowia lipolytica*. 2. Hidrocarbonetos. 3. Petróleo.
4. Biorremediação. 5. Biossurfactante. 6. Biofilme. I. Título.

CDU 574.6

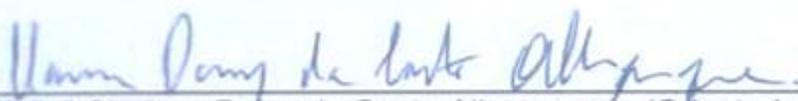
SCALE UP DE PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL EM ÁGUA DO MAR POR *Candida lipolytica* UCP0988

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais

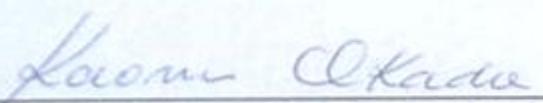
HAMILTON FELIX NOBREGA

Aprovada em: 15/04/2016

Examinadores:



Profª Drª Clarissa Daisy da Costa Albuquerque (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Profª Drª Kaoru Okada (Membro Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Profª Drª. Norma Buarque de Gusmão (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico às duas mulheres da minha vida...

AGRADECIMENTOS

Aos familiares,

Em primeiro lugar, agradeço a minha filha, por ser minha maior fonte de motivação e razão de todas as coisas que busco nessa vida. Lavínia, Pai te ama!

A meus pais, João Batista Nobrega e Maria Felix de Menezes (*In memoriam*) e a minha grande amiga e companheira, Gilmara Rosendo de Lima, que me acompanharam nessa batalha diária, pelo apoio, incentivo e compreensão pelas minhas ausências e estresses, para que eu pudesse concretizar mais este objetivo.

À minha orientadora,

Exemplo de ética e profissionalismo, Prof^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, agradeço pelo carinho e dedicação com os quais sempre me tratou, pelos ensinamentos que me passou, e por acreditar no meu trabalho e na minha vontade de aprender.

Aos professores,

Carlos Medeiros, Walmir Araújo e Wallace Batista, por terem sido professores que sempre me incentivaram durante a vida acadêmica e que se tornaram grandes amigos.

Aos professores Carlos Alberto, Valdemir, Kaoru Okada, Aline Elesbão e Galba Takaki, por terem prestado informações fundamentais durante os dois anos do mestrado, pelos momentos que recorri para esclarecer alguma dúvida e por terem contribuído significativamente com mais esta formação acadêmica e profissional.

A professora Leonie Sarubbo e Raquel Rufino, por terem contribuído permitindo realizar análises no laboratório de microbiologia, quando se fez necessário.

Aos técnicos e funcionários do NPCIAMB,

Sr. Humberto e André Felipe, pela ajuda, atenção e por estarem sempre dispostos a colaborar na execução dos trabalhos e a Dona Sônia e demais funcionários que sempre me trataram de forma cordial. Aos que fazem parte da secretaria da pós-graduação; Nicéas, Sérgio e Nélia, pela gentileza no atendimento prestado durante o curso.

Aos amigos,

Aos amigos da 10^a turma do PPGDPA, com os quais trabalhei durante dois anos, dentro do laboratório e com os quais dividi angústias, estresses, momentos difíceis, momentos de descontração e de desabafos;

Ana Carla, que sempre foi a pessoa que mais agitava os demais com brincadeiras e seu humor extrovertido, fazendo com que as coisas fluíssem com menos estresses.

Patrícia Nunes, a pessoa mais centrada do grupo e também a mais habilidosa nas pesquisas e experimentos. Ouvia muito, falava pouco. O semblante já demonstra a seriedade da criatura!

Keissy Vanderlei, a moleca da turma. Intermediária entre Ana e Patrícia, mas uma pessoa de grande maturidade para a idade que possui. Sempre dávamos uma pausa para conversas para dissipar os estresses.

Meninas, alguns momentos foram desafiantes e desmotivadores. Outros, descontraídos e hilariantes. Mas, enfim, chegamos lá. Obrigado pela companhia de vocês.

A todos os amigos que fiz no laboratório que sempre se mantiveram disponíveis para elucidar minhas dúvidas, em especial a:

Davi Cavalcanti, companheiro de conversas e de experimentos, que sempre me ajudou orientando a melhor forma de executar as atividades. Hoje, tornou-se um grande amigo.

Marcos Luna, o cara que sempre está disposto a ajudar. Uma pessoa humilde, de uma simplicidade singular. Precisamos de mais Marcos por aí...

Dailyn Rubio, a cubana que fala alto, muito inteligente e dedicada. As vezes brigava comigo. Uma relação de amor e ódio!

Adriana Ferreira, Rosileide Fontenele, Thayse Alves, que colaboraram direta e indiretamente em alguns momentos na execução deste trabalho, além de serem parceiros de conversas em momentos de descontração.

De acordo com a análise de Pareto, meus amigos, vocês todos foram significativos para o meu resultado final. Obrigado!

Institucionais

À Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelas análises cromatográficas realizadas, em particular, ao técnico do laboratório, Pablo Medeiros, pela gentileza e educação com os quais sempre me tratou.

À FACEPE, pelo apoio financeiro para execução do projeto durante os dois anos dos trabalhos.

“Tem sido uma amarga penitência para mim, digerir a conclusão de que ‘essa corrida é para os fortes’ e que eu provavelmente farei pouco mais do que me contentar em admirar os avanços que outros obtiverem na ciência”
(Charles Robert Darwin).

RESUMO

Estratégia de ampliação e escala em dois estágios foi adotada para ampliar o processo de biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar da escala de frascos de Fernbach de 2.8 L para escala de biorreator de bancada de 5L. Planejamento fatorial completo 2² foi realizado, em escala de frascos de Fernbach, para investigar os efeitos da concentração inicial de biomassa (inóculo) e da agitação sobre a concentração de biomassa, o pH, a tensão superficial e a percentagem de biodegradação do total de hidrocarbonetos, após 216h. A agitação influenciou a concentração de oxigênio dissolvido, que por sua vez afetou o crescimento, bem como a biodegradação de hidrocarbonetos. Em ambas escalas, a levedura utilizou o óleo diesel, tipo B7, a 10%, como única fonte de carbono e energia, degradando total ou parcialmente hidrocarbonetos alifáticos, ramificados e não ramificados e hidrocarbonetos aromáticos. Estes últimos, apresentaram maior resistência a biodegradação. A formação de biofilme contribuiu para aumentar a eficiência da degradação de hidrocarbonetos. Em escala de biorreator de 5L, após 9 dias de processo de biodegradação de óleo diesel foram sintetizadas 7,2 g/L de massa celular, em líquido metabólico com pH, salinidade, tensão superficial e atividades de emulsificação para emulsões com n-hexadecano, óleo diesel e óleo de milho, respectivamente iguais a 3,3; 47%, 38,36 mN /m, 4.416 UAEA; 4.409 UAE e 4.024 UAE. Foi constatada a biodegradação de aproximadamente 67% dos picos de hidrocarbonetos resolvidos por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. A estratégia de scale-up adotada foi eficaz podendo ser empregada na ampliação do processo para escalas maiores.

Palavras-Chaves: *Yarrowia lipolytica*, hidrocarbonetos, petróleo, biorremediação, biossurfactante, biofilme.

ABSTRACT

Strategy scale-up in two stages was adopted to the process of biodegradation diesel *Candida lipoytica* UCP 0988 in sea water, in 2.8-L Fernbach flasks and in 5-L bench bioreactor to study the effects of agitation, aeration and inoculum concentration on diesel oil degradation process by *Candida lipolytica* UCP 0988 in sea water. 22 full factorial design was carried out on a scale of Fernbach flasks, to investigate the effects of the initial biomass concentration (inoculum) and agitation on the biomass concentration, pH, surface tension and the rate of biodegradation of total hydrocarbons after 216h. Stirring influence the concentration of dissolved oxygen, which in turn affected the growth and hydrocarbon biodegradation. In both scales, the yeast used diesel oil, B7 type, 10% as a sole source of carbon and energy, degraded partially or totally aliphatic, branched and unbranched hydrocarbons and aromatic hydrocarbons. The latter showed increased resistance to biodegradation. Biofilm formation contributed to increase hydrocarbon degradation efficiency. Scale 5L bioreactor after 9 days of diesel oil biodegradation process were synthesized 7.2 g/L cell mass in metabolic liquid with pH, salinity, surface tension and emulsifying emulsions activities with n-hexadecane, diesel oil and corn oil, respectively equal to 3.3; 47%, 38.36 mN / m 4,416 UEA; 4,409 UEA and 4,024 UEA. It was also verified biodegradation of approximately 67% of the hydrocarbon peaks resolved by gas chromatography / mass spectrometry. The scale-up strategy adopted was effective and can be used in the *scale up* process to larger scales.

Key Words: *Yarrowia lipolytica*, hydrocarbons, petroleum, bioremediation, biosurfactant, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1	Tipos de biorreatores: (a) STR; (b) Coluna de bolhas; (c) “air lift”; (d) fluxo em pistão; (e) leito fixo; (f) leito fluidificado; (g) reator com membranas planas; (h) fibra oca.....	25
FIGURA 2	Principais etapas de um processo fermentativo genérico em um biorreator.....	26
FIGURA 3	Processo de ampliação de escala.....	28
FIGURA 4	Derivados de petróleo e suas aplicações.....	30
FIGURA 5	Estruturas e nomenclaturas IUPAC dos HAPs mais frequentes.....	32
FIGURA 6	Mancha que percorreu 6km e chegou à praia de Tramandaí (RS)..	38
FIGURA 7	Representação esquemática da formação de um biofilme ativo.....	43
FIGURA 8	Sequencia de reações durante a degradação de n-alcanos.....	49
FIGURA 9	Sequencia de formação do catecol (a) e protocatecolato (b) durante a degradação do benzeno.....	50
FIGURA 10	Ortoclivagem (a) e metaclivagem (b) do anel aromático.....	51
FIGURA 11	Vias metabólicas de assimilação de fontes típicas de carbono no cultivo de <i>C. lipolytica</i>	53
FIGURA 12	<i>C. lipolytica</i> UCP 0988.....	55

CAPÍTULO II

FIGURA 1	Produção de biomassa em biodegradação de óleo diesel em água do mar e água destilada.....	77
FIGURA 2	Ensaio teste e controles em biodegradação de óleo diesel em água do mar e água destilada.....	77
FIGURA 3	Efeitos da salinidade no pH (a-d), na tensão superficial (b-e) e na	

concentração de biomassa (c-f) em meios a base de água do mar e água destilada.....79

CAPÍTULO III

- FIGURA 1 Diagramas de Pareto de efeitos padronizados da concentração inicial de biomassa e da taxa de agitação sobre as variáveis dependentes do PFC 2² com 216 h : (a) biomassa (b) pH (c) tensão superficial e (d) percentagem de biodegradação de HTP. O ponto em que os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical tracejada..... 93
- FIGURA 2 Perfis cinéticos de: (a) biomassa (b) pH (c) tensão superficial e (d) salinidade para o melhor ensaio do PFC 2² e para os correspondentes controle negativo, positivo e abiótico.....94
- FIGURA 3 Concentrações residuais de heptano, 2,3,4-trimetil- (7C_rmfc); Octano, 2-metil- (8C_rmfc); Nonano; Decano,2-metil- (10C_rmfc); Undecano,4-metil (11C_rmfc); Dodecane, 2,7,10-trimetil- (12C-br); Tridecano, 3-metileno (13C = br) em 0h e 216 h.....96
- FIGURA 4 Tempos de biodegradação do óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 na água do mar suplementado com sulfato de amônio e fosfato de potássio monobásico em: (i) escala 2.8.L Fernbach e (ii) em escala de bancada-biorreator 5 L.....98
- FIGURA 5 Formação de biofilme em escala de frasco de Fernbach de 2.8.L e em escala de biorreator bancada de 5 L, durante processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio.....99
- FIGURA 6 Análise de GC-MS de biodegradação de 10% (v / v) de óleo diesel em B7 5L biorreator por *C. lipolytica* UCP 0988. (a) amostra abiótica controle em 0h, (b) amostra do controle abiótico em 216h, (c) amostra do teste Biotico à 0h e (d) amostra de teste Biotico a 216 h.....101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1	Frações de destilação do petróleo.....	30
TABELA 2	Especificações físico-químicas para o óleo diesel.....	33
TABELA 3	Principais fatores que afetam a biodegradação	45
TABELA 4	Nível de biodegradabilidade de alguns constituintes de petroderivados.....	46

CAPÍTULO II

TABELA 1	Comparação de modelos cinéticos e parâmetros para o crescimento de <i>Candida lipolytica</i> 0988 UCP 0988 em processos de biodegradação em óleo diesel utilizando como diluente a água do mar e água destilada.....	77
----------	--	----

CAPÍTULO III

TABELA 1	Condições operacionais e nutricionais iniciais utilizadas em estratégia de ampliação de escala, em dois estágios, de processo biodegradação de óleo diesel por <i>C.lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar, suplementada com sais de nitrogênio e fósforo	85
TABELA 2	Valores da concentração inicial de biomassa e da velocidade de agitação em diferentes níveis do planejamento fatorial completo 2^2	86
TABELA 3	Valores dos fatores (variáveis independentes) e das variáveis respostas (variáveis dependentes) do planejamento fatorial completo 2^2 realizado em duplicata.....	90
TABELA 4	Modelos de ordem para a biomassa 216h, pH, tensão superficial e porcentagem de biodegradação com a função de 0h biomassa e taxa de agitação 0h.....	91

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
SUMÁRIO	18
CAPÍTULO I	21
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVOS.....	25
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	25
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	25
1.2 REVISÃO DA LITERATURA	26
1.2.1 <i>Ampliação de escala</i>	26
1.2.1.1 Ampliação de escala em processos biotecnológicos	26
1.2.1.2 Importância da ampliação de escala em processos biotecnológicos	28
1.2.1.3 A modelagem no processo de ampliação de escala	29
1.2.1.4 Ampliação de escala em biorreator	30
1.2.1.5 Princípios de bioprocessos para ampliação de escala em biorreator	33
1.2.1.6 Escalas de desenvolvimento de processos em biorreatores.....	34
1.2.2 <i>Petróleo e derivados</i>	35
1.2.2.1. Óleo Diesel	37
1.2.2.2 Características físico-químicas e toxicológicas do Diesel	38
1.2.3 <i>Contaminação Ambiental por Petróleo e seus Derivados</i>	40
1.2.3.1 Contaminação em ambientes marinhos	41
1.2.3.2 Ocorrências recentes de contaminação por petróleo em ambiente marinho	42
1.2.4 <i>Processos de Descontaminação Ambiental</i>	44
1.2.4.1 Processos físicos e químicos	44
1.2.4.2 Processo biológico: Biorremediação	45
1.2.4.2.1 Biodegradação por micro-organismos.....	46
1.2.4.2.2 Vias e mecanismos de degradação do petróleo por micro-organismos.....	50
1.2.5 <i>Biodegradação de hidrocarbonetos de diesel</i>	50

1.2.5.1 Fatores que Influenciam na Biodegradação	50
1.2.5.2 Aspectos Bioquímicos da biodegradação de hidrocarbonetos	54
1.2.6 Água do Mar	57
1.2.6.1 Biodegradação de petróleo e derivados em água do mar	58
1.2.7 <i>Candida lipolytica</i>	58
1.2.7.1. Metabolismo de alcanos por <i>Candida lipolytica</i>	61
1.2.7.2 Produção de biossurfactantes por <i>Candida lipolytica</i>	62
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO II	73
ARTIGO I: Efeito da salinidade sobre a biodegradação de óleo diesel por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988.....	74
1. Introdução	75
2. Material e métodos	76
2.1. Micro-organismo	76
2.2. Óleo diesel.....	76
2.3. Água do mar	76
2.4. Experimentos testes e controles de biodegradação de óleo diesel.....	76
2.5. Cinéticas de variáveis ambientais em biodegradação de óleo diesel em água do mar e em água destilada	76
2.6. Análises	77
3. Resultados e discussão.....	77
3.1. Cinética de crescimento de <i>C. lipolytica</i> UCP 0988 em biodegradação de óleo diesel em água do mar e água destilada	77
3.2. Ensaio testes e controles.....	78
3.3. Modelagem.....	79
3.4. Efeitos da salinidade.....	79
Conclusão	80
Referências	81
CAPÍTULO III	82
ARTIGO II: Ampliação de escala de processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar mediada por biofilme de <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988.....	83

Resumo.....	84
1. Introdução	85
2. Materiais e métodos	86
2.1. Micro-organismo e meio de manutenção	86
2.2. Óleo diesel.....	87
2.3. Água do mar	87
2.4. Estratégia em dois estágios para ampliação de escala (scale-up) de processo de biodegradação de óleo diesel por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar.....	87
2.5 Planejamento fatorial completo 22 em escala de frasco de Fernbach	89
2.6 Estimativa de massa celular	90
2.7 Tensão Superficial.....	90
2.8 Atividade de Emulsificação.....	90
2.9 Índice de emulsificação	91
2.10 Determinação da salinidade e gravidade específica	91
2.11 Extração do Óleo Diesel	91
2.12 Análise da degradação do diesel por cromatografia gasosa e espectrometria de massa	92
3. Resultados e discussão.....	92
3.1 Primeiro estágio - Estudos de biodegradação de óleo diesel em escala de frasco de Fernbach (2,8 L)	93
3.2 Segundo estágio - Biodegradação do óleo diesel em BIOFLO 2000 biorreator (5 L) ...	100
Conclusão	108
Referências	108
CAPÍTULO IV	112
CONCLUSÕES GERAIS.....	113
ANEXOS.....	114

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, o desenvolvimento de bioprocessos vem crescendo em tecnologia, procedimentos, produtividade e rendimento, ocasionando uma busca na formação de pessoal e das competências dos pesquisadores envolvidos, com o objetivo de se ampliar as escalas de produção dos produtos de interesse, sob um ponto de vista econômico (OTERO; NIELSEN, 2010), principalmente na produção de artigos de grande valor comercial.

Um exemplo emblemático de uma ampliação de bioprocessos da escala de laboratório para escala industrial é produção de penicilina, que foi iniciada há mais de 70 anos e após sucessivas melhorias no desenvolvimento do processo de ampliação de escala, hoje atinge uma marca 100.000 vezes maior do que a original (ROKEM et al., 2007; WANG et al., 2015).

Essa perspectiva em bioprocessos tem permitido sua aplicação em processos de biorremediação, inclusive no tratamento de resíduos de petróleo, tais como os gerados por combustível diesel, que pode causar sérios danos ao meio ambiente e aos organismos vivos (PAIXÃO et al., 2007; DE BARROS et al., 2014)

A aplicabilidade de tratamentos varia de acordo com fatores tais como, características do óleo, do local contaminado, do potencial bioquímico dos micro-organismos e da natureza da operação de gerar contaminação, como por exemplo, exploração, refino, armazenagem, distribuição, transporte (DE BARROS et al., 2014).

Poluição do meio ambiente por vários hidrocarbonetos de petróleo é um grande problema. Desastres ecológicos que ocorrem com frequência em grande escala, mostram o quão é importante dispor de técnicas apropriadas que possam ajudar na rápida remediação do meio ambiente (KACZOREK et al., 2015).

A exploração, o refino, o transporte e até mesmo a comercialização de petróleo e seus derivados, são atividades com alto potencial de causar impacto ambiental, seja por riscos de possíveis incidentes com derrames de óleo ou os riscos ambientais inerentes a cada processo que envolva os óleos pesados (XU et al., 2013; XUE et al., 2015). As refinarias, devido a sua natureza de processar o

petróleo bruto, tem esses riscos aumentados decorrentes do alto volume envolvido em suas operações (ONUR, 2015).

Em Pernambuco, localizada no Complexo Industrial e Portuário de Suape, a refinaria Abreu e Lima, dentre todas as refinarias brasileiras, tem a maior taxa de conversão de petróleo cru em diesel (70%), com capacidade de processamento de 230 mil barris de petróleo por dia, tendo como objetivo principal produzir óleo diesel e viabilizar o atendimento da demanda de derivados da região Norte e Nordeste, com redução das importações (PETROBRÁS, 2015).

Os derramamentos de petróleo são difíceis de se evitar durante o processamento e entrega final do petróleo (FUENTES et al., 2014). Diante dessa problemática e com o início das operações da Refinaria previsto para 2018 (PETROBRÁS, 2015), os problemas decorrentes de derramamentos de petróleo e derivados e de despejos de efluentes industriais na costa brasileira devem aumentar, assim como as responsabilidades técnico-científica e sócio-econômica-ambiental dos setores industrial, acadêmico e governamental.

Os acidentes ocorridos no Rio de Janeiro, em 2011, com as empresas petrolíferas Chevron e Modec, alertam para a urgência da implantação de um plano estadual de contingência contra vazamento de petróleo e derivados e de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de técnicas eficazes de biorremediação de ambientes marinhos e terrestres contaminados por petróleo e derivados (ALBUQUERQUE, 2013).

Recentemente Moscoso et al. (2015), obtiveram resultados promissores em processo de biodegradação de hidrocarbonetos em escala de frascos utilizando *Pseudomonas stutzeri* CET 9030, o que os fez partir para escala de biorreator de bancada, onde também obtiveram resultados satisfatórios para contaminantes estruturalmente diferentes, como fluido de trabalho de metais, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e inseticidas com clorpirifos, evidenciando a viabilidade da *Pseudomonas stutzeri* CET 9030 para aplicação em processo de biodegradação em escala industrial.

O óleo diesel, em suas diversas denominações, é o principal petroderivado comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de

passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas (PETROBRÁS, 2014).

Diante do fato do óleo diesel ser um dos principais produtos que será produzido pela Refinaria Abreu e Lima, foi escolhido para ser o contaminante a ter sua biodegradação verificada, sendo utilizado como única fonte de carbono nos experimentos propostos na presente pesquisa com a levedura *Candida lipolytica* UCP 0988, baseado em resultados de estudos anteriores sobre biodegradação de óleo diesel em água do mar, em escala de frascos (SOUZA et al., 2012).

Tais estudos sugeriram uma ampliação do processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar, por *Candida lipolytica*, com o objetivo de verificar a biodegradação em volumes maiores, visando a possível aplicação desse processo no caso de ocorrências de contaminação com hidrocarbonetos no meio ambiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar a ampliação de escala (*scale-up*) de processo de biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar da escala de frascos para a escala de biorreator de bancada.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Realizar o *scale up* do processo de biodegradação da escala de frascos de Erlenmeyer para a escala de frasco de Fernbach;
2. Realizar o *scale up* do processo de biodegradação da escala de frasco de Fernbach para a escala de biorreator de bancada;
3. Investigar o efeito da salinidade sobre o processo de biodegradação;
4. Investigar os efeitos da agitação e da concentração do inóculo sobre o consumo de óleo diesel, a concentração de biomassa, a atividade de emulsificação, a tensão superficial e eficiência da biodegradação;
5. Analisar a redução de hidrocarbonetos nas amostras obtidas em processos de biodegradação de óleo diesel.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Ampliação de escala

A ampliação de escala é um procedimento em que os resultados experimentais com equipamento de menor escala são empregados para projetar e construir um sistema de maior escala, sendo considerado um importante passo no desenvolvimento de processos. Em geral, o desenvolvimento de um processo tem início em uma escala de produção menor, passando posteriormente para uma escala maior, sendo que experiências em pequena escala tem uma tendência em predeterminar os parâmetros de desempenho em escalas maiores (OKONKOWSKI et al., 2005; FARREL, 2012).

No desenvolvimento de um processo, quando são encontradas condições econômicas adequadas de operação em escala reduzida, as quais com frequência correspondem à obtenção de valores elevados para a produtividade e rendimento do produto de interesse, sob o ponto de vista econômico, há a necessidade de se ampliar a escala de produção, sendo essa variação denominada de ampliação de escala ou *scale-up* (EINSELE, 1978; PEREIRA; LEMOS, 2004). O objetivo de um processo de aumento de escala é ampliar as quantidades de produção com produtividade e qualidade semelhantes ou superior (QU; REN; HUANG, 2013).

1.2.1.1 Ampliação de escala em processos biotecnológicos

A ampliação em bioprocessos normalmente é realizada em três escalas: bancada, na qual procedimentos básicos e parâmetros de processo são especificados; piloto, na qual as condições de operação são otimizadas; e industrial, na qual o processo deve ser economicamente viável. O sucesso dessa atividade depende da identificação do critério de ampliação de escala mais adequado para cada processo (OKONKOWSKI, 2005). Uma ampliação de escala eficaz é a chave para a resolução efetiva de problemas em grande escala, e seu desenvolvimento deve ser uma prioridade (JUNKER, 2004).

Entretanto, é importante que um processo de produção possa ser operado tanto em pequena, quanto em grande escala, sendo fundamental do ponto de vista de desenvolvimento de processos, pois a variação de escala tem grande importância para a otimização, uma vez que tanto se pode ter uma redução de escala (*scale down*), quanto uma ampliação de escala (*Scale up*). Portanto, o processo de *downstream* deve ser levado em consideração no processo de ampliação de escala, pois grandes volumes e/ou concentração de produtos podem interferir em sua estratégia (BAART et al., 2007).

Ao longo das últimas décadas, as fermentações em escala industrial, utilizando uma ampla gama de micro-organismos, células vegetais e animais tem sido extensivamente utilizada para a produção de produtos comerciais, tais como substâncias alimentares, biomateriais, vacinas, produtos farmacêuticos, pigmentos e biocombustíveis (OTERO; NIELSEN, 2010). Decisões econômicas sobre os investimentos para novos bioprocessos são normalmente baseados em resultados em escala de laboratório (TAKORS, 2012; WANG et al., 2015).

Um exemplo importante tem sido a fabricação industrial de penicilina, que foi iniciada há mais de 70 anos e a produtividade das atuais linhagens está 100.000 vezes maior do que a estirpe original, por meio de sucessivas implementações de projetos de biorreatores, planejamento de experimentos e otimizações de processos (ROKEM et al., 2007; WANG et al., 2015).

Geralmente antes de ampliar a escala de bioprocessos, todos os parâmetros devem ser inicialmente otimizados através de um cultivo em pequena escala. No entanto, nem sempre os parâmetros otimizados podem ser transferidos diretamente de pequenos cultivos para cultivos maiores, devido à inconsistência de condições entre eles (LI et al., 2015)

Hoje, o desenvolvimento de novos bioprocessos é muitas vezes uma estratégia de tentativa e erro, que depende fortemente da formação profissional e da competência do pessoal técnico e dos cientistas ligados às pesquisas. Geralmente leva cerca de 5 a 10 anos a partir das primeiras discussões para a criação final de um processo em grande escala bem sucedido (NEUBAUER et al., 2013).

Em laboratórios de pesquisa, a caracterização do estado metabólico das células é realizada principalmente em sistemas de cultura homogêneos. Abordagens

analíticas para uma compreensão abrangente das redes metabólicas em culturas microbianas são baseadas, principalmente, em culturas desenvolvidas em pequena escala, que estão em um estado de equilíbrio ou se submetem a mudanças dinâmicas. No entanto, observa-se que em uma ampliação de escala de bioprocessos é importante compreender que as células em biorreatores de grande escala são expostas continuamente a mudanças rápidas, devido a um ambiente não homogêneo. Abordagens analíticas que buscam uma compreensão de bioprocessos em grande escala precisam aplicar simuladores específicos (NEUBAUER; JUNNE, 2010).

1.2.1.2 Importância da ampliação de escala em processos biotecnológicos

Atualmente o desenvolvimento de processos biotecnológicos em microbiorreatores e minibiorreatores tem desempenhando um importante papel na triagem das melhores condições de operação e rendimento, permitindo o monitoramento e estratégias de controle para cultivo em escala maior de produção (GERNAEY et al., 2012; LATTERMANN; BUCHS, 2015).

Estudos sobre a ampliação de escala de processos biotecnológicos têm focado principalmente em escala de laboratório, uma vez que é difícil manter todos os parâmetros físicos ou químicos constantes durante o curso do processo. No decorrer da ampliação de um processo, a partir de escala em volume laboratorial, é essencial conhecer os fatores críticos que afetam a implementação do *scale-up* para as escalas piloto e industrial (QU; REN; HUANG, 2013).

Os perfis de concentração em biorreatores de produção industriais caracterizam-se pelo aparecimento de grandes gradientes de concentração. As células em reator de larga escala passam por mudanças constantes em seu ambiente, podendo ter sua fisiologia alterada em comparação com células que foram cultivadas em escalas menores. Como consequência, bioprocessos em grande escala são frequentemente caracterizados por uma forte dinâmica com a qual as células são forçadas a lidar (NEUBAUER; JUNNE, 2010).

Um dos principais desafios para a biotecnologia industrial é o desenvolvimento de processos em larga escala. Um processo de *Scale up* bem sucedido requer uma

boa compreensão das interações entre o biocatalisador, a química e o ambiente físico no reator. No entanto, é difícil de controlar o ambiente físico durante o processo de aumento de escala (TUFVESSON et al., 2010).

1.2.1.3 A modelagem no processo de ampliação de escala

Em geral, na indústria biotecnológica e na engenharia de bioprocessos, os modelos são usados em projeto, controle e otimização (TABRIZI et al., 2011). A complexidade dos bioprocessos tem impulsionado a crescente busca por projetos e controles mais eficientes, exigindo modelos mais precisos e robustos (PREISIG, 2010; CHATRE et al., 2011).

Modelos não são utilizados apenas para descrever os organismos vivos, eles também são essenciais para mapear sistemas complexos em menor dimensão e obter medições indiretas quando aplicados como sensores baseados em *software* ou *softsensores* (NEUBAUER et al., 2013).

O significado de modelagem em biotecnologia aumentou significativamente dentro do contexto de biologia de sistemas, visando compreender os complexos mecanismos de regulação dinâmica dos sistemas celulares (KITANO, 2002a; KITANO, 2002b). Diversos modelos, que descrevem satisfatoriamente processos complexos desenvolvidos em grande escala (MANENTI, 2011), também vem sendo relatados na literatura.

A combinação adequada das técnicas de simulação de grande escala de sistemas heterogêneos, juntamente com modelos detalhados para o comportamento celular, deve produzir modelos precisos para bioprocessos em grande escala (NEUBAUER et al., 2013).

Apesar de algumas abordagens pretenderem realizar a análise e a modelagem de sistemas biológicos com métodos normalmente aplicados em engenharia; conceitos como reutilização (usando modelos criados para outros organismos) e modularidade (descrevendo a célula como um conjunto de módulos diferentes) são difíceis de serem aplicados em engenharia de bioprocessos (CSETE; DOYLE, 2002). Uma das principais razões é que a dinâmica celular, estrutura, resistência e

crescimento dependem fortemente das condições extracelulares (NEUBAUER et al., 2013).

No geral, para desenvolver modelos de sistemas biológicos é necessário identificar parâmetros chaves e obter dados representativos dos mesmos. Na maioria dos casos, o esforço experimental para a estimativa de parâmetros aumenta exponencialmente à medida que cresce a complexidade do modelo. Diante disso, obter informações sobre a dinâmica celular (rede metabólica e expressão de genes reguladores da célula) durante o *scale-up* de bioprocessos, é um dos mais importantes desafios a serem superados pela modelagem (NEUBAUER et al., 2013).

1.2.1.4 Ampliação de escala em biorreator

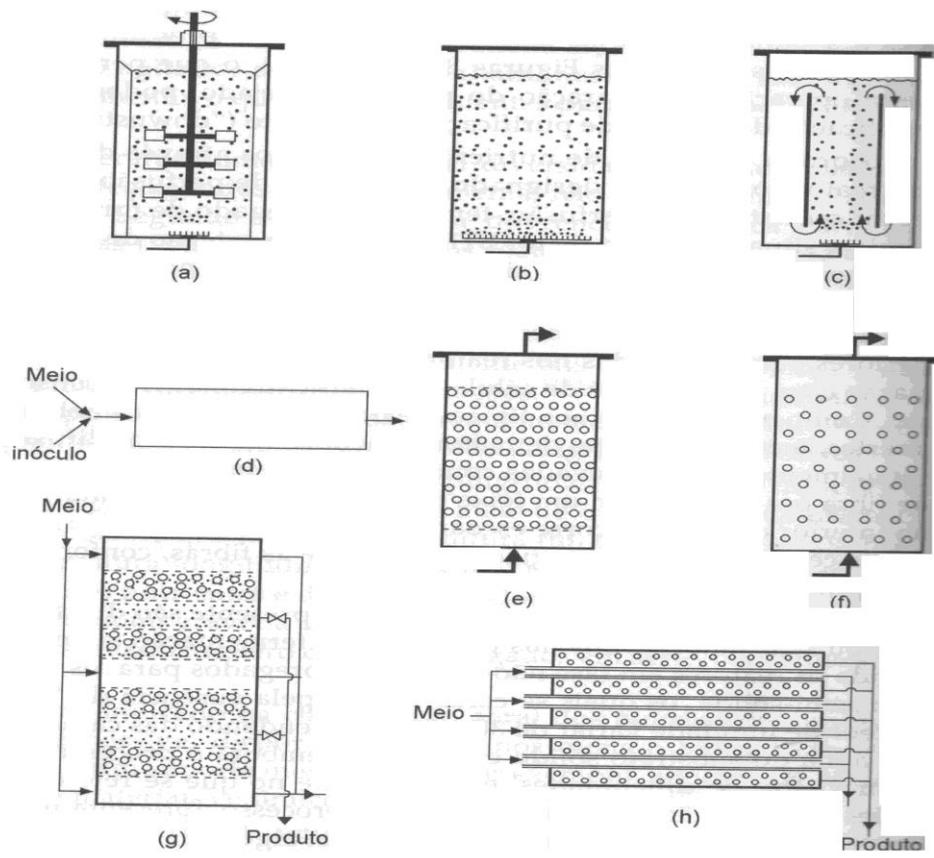
Em qualquer processo biotecnológico, o elemento principal é o biorreator, pois, devidamente controlado, permite obter as transformações desejadas. Biorreatores são reatores onde ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por biocatalizadores. Os agentes das transformações em biorreatores podem ser enzimas (processo enzimático) ou micro-organismos vivos (processo fermentativo) (SCHARF JUNIOR et al., 2015). Os biorreatores são classificados em:

- ❖ Reatores em fase aquosa
 - Células livres
 - ✓ Reatores agitados mecanicamente (STR stirred tank reactor)
 - ✓ Reatores agitados pneumaticamente
 - Coluna de bolhas (bubble column)
 - Reatores air lift
 - ✓ Reatores de fluxo em pistão
 - Células imobilizadas em suportes
 - ✓ Reatores de leito fixo
 - ✓ Reatores de leito fluidificado
 - Células confinadas entre membranas
 - ✓ Reatores com membranas planas
 - ✓ Reatores de fibra oca (hollow fiber)
- ❖ Reatores em fase não-aquosa

- Reatores estáticos
- Reatores com agitação
- Reatores de leito fixo
- Reatores com leito fluidificado gás - sólido

A figura 1 apresenta esquemas dos tipos de reatores mencionados acima.

FIGURA 1. Tipos de biorreatores: (a) STR; (b) Coluna de bolhas; (c) “air lift”; (d) fluxo em pistão; (e) leito fixo; (f) leito fluidificado; (g) reator com membranas planas; (h) fibra oca.

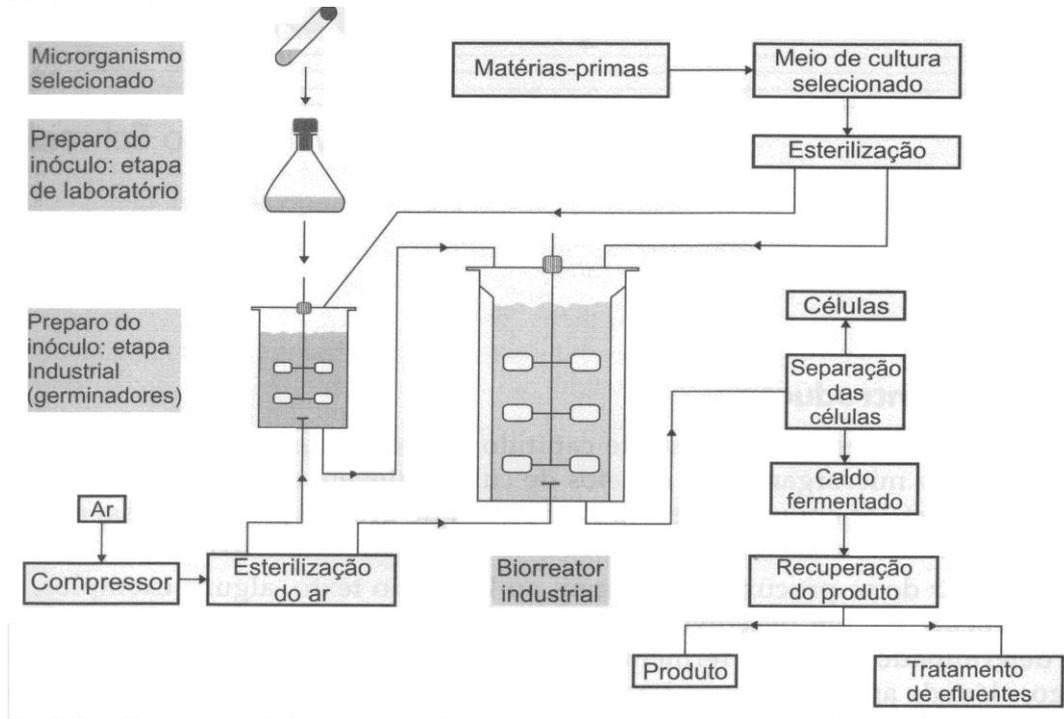


Fonte: SCHARF JUNIOR (2015)

Além da importância dos biorreatores, os processos de *Upstream* (tratamentos iniciais que antecedem a operação) e *Downstream* (tratamentos finais que englobam produtos e subprodutos), também são importantes e devem ser cuidadosamente considerados (SCHARF JUNIOR et al., 2015), ou seja, não só o equipamento, mas também os processos que são observados, devem ser ampliados (NEUBAUER;

JUNNE, 2010). A figura 2 apresenta as principais etapas de um processo fermentativo genérico, utilizando biorreator.

FIGURA 2. Principais etapas de um processo fermentativo genérico em um biorreator.



Fonte: SCHARF JUNIOR (2015)

No desenvolvimento de bioprocessos, ampliar progressivamente para volumes maiores utilizando-se de biorreatores para desenvolvimento e implantação de processos, é fundamental, uma vez que biorreatores são amplamente utilizados em uma grande variedade de processos biológicos (tais como a fermentação aeróbia e tratamentos de efluentes biológicos, entre outros) (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; CLARKE, 2013).

A tarefa é bastante complexa e apesar dos biorreatores serem primordiais à ampliação de diferentes escalas, existem vários parâmetros que influenciam os fenômenos de transporte e a dinâmica química dentro de um biorreator, além dos parâmetros físicos e operacionais (SCHIMDT, 2005; CLARKE, 2013)

Em biorreatores, de início, os processos são realizados em escala reduzida, em condições previamente otimizadas; nas quais parâmetros - como pH,

temperatura, pressão, taxa de agitação e concentrações de biomassa e nutrientes - juntamente com um modo operacional – descontínuo (batelada, batelada alimentada e por células em repouso, contínuo) ou contínuo – são pré-estabelecidos de maneira a regular a catálise, promovendo um melhor rendimento em biomassa e/ou produto, além de tentar minimizar os custos de produção (CLARKE, 2013; DABHOLE, 2015). No entanto, os parâmetros otimizados em cultivos em pequena escala, podem não ser reproduzidos diretamente para grandes fermentações, devido à diferença nas formas de cultivo (LI et al., 2015).

Para garantir a confiabilidade de um processo de ampliação de escala em biorreator, há a necessidade de aplicação de estratégias de controle para melhorar a faixa de operação e a robustez do processo. Dessa forma, pode-se desenvolver *softsensores*, com os quais os modelos são ajustados para condições industriais específicas, permitindo um projeto de *softsensor* válido em grande escala (NEUBAUER et al., 2013).

1.2.1.5 Princípios de bioprocessos para ampliação de escala em biorreator

O desafio para a ampliação de escala de um bioprocessos ser bem sucedida, é manter as cinéticas das variáveis em valores ótimos, durante todo o processo de aumento de escala, conforme foram desenvolvidas em escala reduzida (MARQUES et al., 2010)

Para manter o estado fisiológico ótimo dos micro-organismos, todas as variáveis físicas e mecânicas devem, idealmente, permanecer as mesmas, sem ignorar fatores essenciais como transferência de oxigênio, mistura de nutrientes e tensão superficial, que são importantíssimos na ampliação de escala de bioprocessos. Mudanças nestes parâmetros invariavelmente alteram o metabolismo microbiano, comprometendo, assim, parâmetros cinéticos, tais como rendimentos e produtividades (MARQUES et al., 2010; CLARKE, 2013),

Pode-se lançar mão do princípio da semelhança geométrica que implica na utilização de proporções idênticas entre pequenas e grandes escalas. Desta forma, o efeito de diferentes escalas pode ser avaliado de forma sistemática (CLARKE, 2013).

1.2.1.6 Escalas de desenvolvimento de processos em biorreatores

Inicialmente utilizam-se biorreatores em escalas menores (escala de frascos), para se investigar qual o melhor micro-organismo a ser utilizado, meio de cultivo que proporcionará um melhor crescimento e quais condições operacionais são mais favoráveis para a formação do produto desejado. Em geral, após a fase de testes em frascos de 250 mL a 1 L e análise dos fatores de produção, passa-se para um biorreator de bancada com capacidade de 1 a 2 litros, o qual é normalmente equipado com sensores de ajuste de temperatura, pH e aeração (NAJAFPOUR, 2007).

A etapa seguinte é o cultivo em um biorreator em escala piloto de 100 a 1000 litros. A cada processo de aumento de escala deve-se observar se há alguma alteração na resposta celular com relação ao rendimento do processo. Se tudo estiver correto, a etapa final seria um biorreator de escala industrial (NAJAFPOUR, 2007). Na Figura 3 encontra-se esquematicamente, o processo de ampliação de bioprocessos da escala de frascos para escala industrial, passando pelas escalas de bancada e piloto.

FIGURA 3. Processo de ampliação de escala



Fonte: O autor (2016)

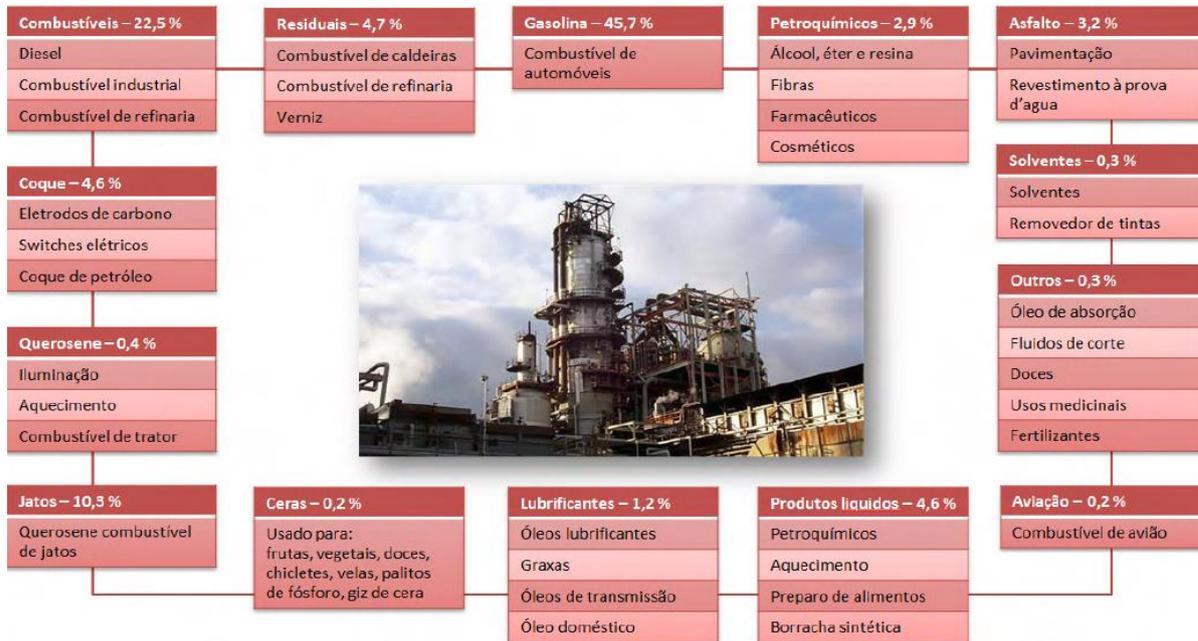
1.2.2 Petróleo e derivados

Petróleo é o termo utilizado para designar ambos, o óleo e o gás natural. É um produto da decomposição de matéria orgânica armazenada em sedimentos, que migra através de aquíferos e fica aprisionado em reservatórios cujo estado físico em condições normais de temperatura e pressão é predominantemente líquido (MILTON et al., 2010; AGARRY; LATINWO, 2015). Trata-se de um óleo cru formado, geralmente, por uma mistura complexa de centenas de hidrocarbonetos, sendo o tipo mais abundante a série dos alcanos (CORRÊA, 2003; AGARRY; LATINWO, 2015). No petróleo as moléculas variam muito de tamanho, desde uma simples molécula de metano (CH₄), até moléculas com quase 100 carbonos (BAIRD, 2002).

A importância do petróleo em nossa sociedade, tal como está atualmente organizada, é extensa e fundamental. Além de sua importância como fornecedor de energia, os seus derivados são a matéria-prima para a manufatura de inúmeros bens de consumo e, deste modo, têm um papel cada dia mais presente e relevante na vida das pessoas (MARIANO, 2008 AGARRY; LATINWO, 2015).

Diante disso, percebe-se que o petróleo ainda permanecerá como a principal fonte de energia nas próximas décadas, porque a produção energética de outras fontes alternativas confiáveis, ainda não é suficiente para substituí-lo (AL-FARAAS et al., 2016). Como exemplos, podem ser citados no fornecimento energético, a gasolina, o querosene e o diesel e outros produtos químicos como reagentes, produtos farmacêuticos, solventes, fertilizantes e plásticos (XUE et. al, 2015).

O petróleo em sua forma natural possui uso limitado. Várias frações do petróleo são produzidas pelo refino do petróleo, usualmente denominado óleo cru. O refino é essencialmente uma destilação fracionada em que diferentes frações são retiradas ao longo de uma coluna (MONTAGNOLLI, 2011). Os tipos e produtos produzidos a partir do refino do óleo cru estão ilustrados na Figura 4.

FIGURA 4. Derivados de petróleo e suas aplicações

Fonte: MONTAGNOLLI (2011).

Uma refinaria converte o petróleo cru por processos que envolvem etapas de destilação, extração, catálise e purificação, devido a diferença de temperaturas de ebulição dos componentes (Tabela 1), que facilitam a separação através do processo de destilação fracionada, e assim gera produtos de diferentes composições (MONTAGNOLLI, 2011).

TABELA 1. Frações de destilação do Petróleo

Fração	Cadeia carbônica	Ponto de ebulição
Gás (Butano, Propano)	C ₁ – C ₄	< 32,2 °C
Gasolina	C ₅ – C ₁₂	32,2 – 104,4 °C
Nafta e Combustíveis de Avião	C ₁₁ – C ₁₃	104,4 – 157,2 °C
Querosene	C ₁₀ – C ₁₃	157,2 – 232,2 °C
Diesel	C ₁₀ – C ₂₀	232,2 – 343,3 °C
Óleos lubrificantes	C ₁₉ – C ₄₀	343,3 – 426,7 °C
Residuais (Ceras e Asfalto)	> C ₄₀	> 426,7 °C

Fonte: MONTAGNOLLI (2011).

Os combustíveis produzidos a partir do petróleo, como gasolina e o óleo diesel, são líquidos de densa energia e relativamente baratos para serem produzidos (BAIRD, 2002). A gasolina é uma das frações mais leves do petróleo, por conter basicamente hidrocarbonetos leves, que geralmente são anéis aromáticos, alcenos e saturados, formados por cadeias que variam de 4 a 12 carbonos. É um dos principais produtos fabricados pelas empresas de petróleo (STREVA et al., 2011).

O diesel mesmo sendo um produto derivado do petróleo, ainda apresenta em sua composição uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sua composição depende da origem do óleo cru utilizado no processo de destilação e das misturas adicionadas na sua formulação final. A biodegradação do óleo diesel é bastante debatida pelo fato de ser um produto intermediário da destilação (MONTAGNOLLI, 2011).

1.2.2.1. Óleo Diesel

O óleo diesel é um produto produzido a partir do refino do petróleo que possui enxofre, nitrogênio e oxigênio em sua composição, mas é basicamente constituído por hidrocarbonetos que variam de 8 a 38 átomos de carbono em sua cadeia, sendo que aproximadamente 40 % são de n-alcenos, 39 % de iso e cicloalcenos e 20 % de aromáticos (NIAZY et al., 2016).

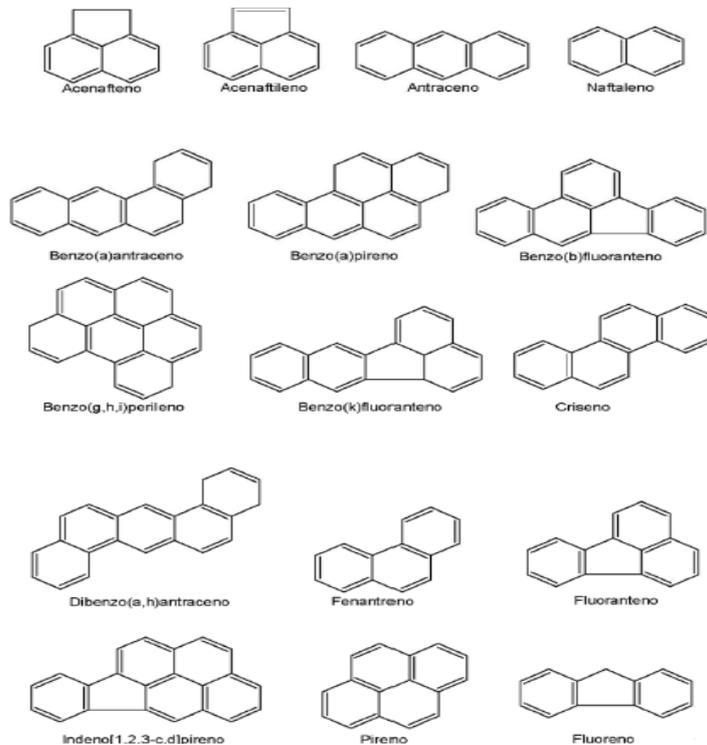
É uma mistura complexa de compostos consistindo primariamente de compostos parafínicos, olefínicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Contudo, a composição de um óleo diesel específico dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação (MARIANO, 2008).

Apesar de ser um dos principais poluentes do meio ambiente, oriundo do seu transporte e armazenamento, o diesel é o principal petroderivado comercializado no Brasil, sendo utilizado para transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia e em máquinas e locomotivas (PETROBRÁS, 2014).

1.2.2.2 Características físico-químicas e toxicológicas do Diesel

Os hidrocarbonetos totais do petróleo que compõem o óleo diesel, incluem os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são compostos por carbono e hidrogênio com anéis de benzeno ligados de forma linear, angular e agrupados em arranjos. Devido a sua natureza lipolítica, os HPAs têm alto potencial de biomagnificação através dos diferentes níveis tróficos (MAKKAR et al., 2003; AGARRY; LATINWO, 2015). A figura 5 apresenta a estrutura química de alguns HPAs.

FIGURA 5. Estruturas e nomenclaturas IUPAC dos HAPs mais frequentes



Fonte: SILVA (2009).

Os HPAs fornecem uma ferramenta útil para o monitoramento às alterações ambientais. Alguns dos compostos de HPAs do óleo diesel, como por exemplo, antraceno e naftaleno estão entre os menos afetados pelo processo de intemperização. Estes compostos semivoláteis com baixa solubilidade e

características recalcitrantes podem persistir por um longo tempo no ambiente (MARIANO et al., 2008; AGARRY; LATINWO, 2015), causando, conseqüentemente, efeitos danosos ao meio ambiente.

A tabela 2 mostra as principais características físico-químicas do diesel, que obedecem às especificações da Agência Nacional do Petróleo, regulamentadas pelo Decreto Federal nº 2.657, pela Resolução ANP nº 50 e pela norma ABNT-NBR 14725-4:2012 (PETROBRÁS, 2014).

TABELA 2. Especificações físico-químicas para o óleo diesel brasileiro

Aspecto:	Líquido límpido (isento de material em suspensão)
Odor:	Característico
Ph:	Não aplicável.
Ponto de fusão/ponto de congelamento:	- 40 – 6°C
Ponto de ebulição inicial e faixa de temperatura de ebulição:	150 – 471°C
Ponto de fulgor:	38 °C Mín.; Método NBR 7974.
Taxa de evaporação:	Não disponível.
Inflamabilidade:	Não aplicável.
Limite inferior/superior de inflamabilidade ou explosividade:	Não disponível.
Pressão de vapor:	0,4 kPa a 40°C
Densidade de vapor:	Não disponível.
Densidade relativa:	0,820-0,865 a 20 °C (Método NBR-7148)
Solubilidade:	Insolúvel em água. Solúvel em solventes orgânicos.
Coefficiente de partição – n-octanol/água:	Log kow: 7,22 (dado estimado).
Temperatura de auto-ignição:	≥ 225°C
Temperatura de decomposição:	400°C
Viscosidade:	2,5–5,5 cSt a 40°C (Método: ASTM D-445)
Faixa de destilação:	100 - 400 °C @ 101,325 kPa (760 mmHg); Método: NBR-9619.

Fonte: PETROBRÁS (2014)

Quanto aos riscos toxicológicos, normalmente os HPAs estão associados a toxicidade crônica. Esse risco inclui o acometimento de câncer, sendo frequentemente resultado da exposição a misturas complexas de aromáticos de risco crônico (alquil-HPA, HPA, benzenos e alquilbenzenos) e não a compostos simples. A inalação e a exposição dérmica são as rotas mais comuns de exposição (GOMES, 2004).

A toxicidade do diesel para os ecossistemas é maior, se comparada com o óleo bruto, por causa do maior teor de gás-óleo e hidrocarbonetos leves. Embora o diesel seja um combustível normalmente utilizado para veículos e máquinas, é reconhecido como uma séria ameaça para os ecossistemas (JAGTAP et al., 2014; AMEEN et al., 2015). No caso de derramamentos é esperado baixa degradação e alta persistência, além de alto percentual de bioacumulação em organismos aquáticos (PETROBRÁS, 2014).

O óleo diesel é um contaminante frequentemente relatado. É considerado uma substância adequada para utilização em estudos para verificar os níveis de contaminação por hidrocarbonetos provenientes de petróleo em derramamentos acidentais ocorridos em instalações operacionais e de transporte (WOLICKA et al., 2009; NIKAKHTARI et al., 2010).

1.2.3 Contaminação Ambiental por Petróleo e seus Derivados

Nas últimas décadas tem se verificado um aumento constante na poluição causada por petróleo e seus derivados, gerando assim, enormes danos ao meio ambiente. Esses problemas vêm aumentando porque o mundo está cada vez mais dependente desses combustíveis para a manutenção de suas atividades industriais (ANDRADE et al., 2010; WICKLIFFE et al., 2014).

A indústria do petróleo traz inúmeros benefícios a sociedade, mas são globalmente reconhecidos como uma atividade econômica com grandes impactos ambientais. Indústrias petroquímicas e refinarias geram uma grande quantidade de resíduos oleosos, classificados de acordo com a NBR 10004 como resíduos de classe I ou resíduos perigosos - resíduos que não podem ser reutilizados ou reciclados, e podem apresentar características como inflamabilidade, corrosividade,

toxicidade, e patogenicidade - (CERQUEIRA et. al, 2011 AGARRY; LATINWO, 2015).

Devido às suas consequências negativas para a saúde e o meio ambiente, por seus efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos já conhecidos, tornou-se, particularmente, uma preocupação global cada vez mais séria (CAO et al., 2009; MOSCOSO et al., 2012; FATHEPURE, 2014).

Em ambientes terrestres a distribuição e o espalhamento dos derivados líquidos de petróleo são menores se comparados à área de mesma quantidade de poluente derramado no mar, rios ou lagoas. No solo a contaminação está relacionada com a percolação, sendo que a natureza físico-química do solo e o tamanho das partículas influenciam diretamente na percolação e na degradação do poluente (GOMES, 2004).

1.2.3.1 Contaminação em ambientes marinhos

Cerca de metade dos produtos de petróleo são transportados em todo o mundo por mar (BALACHANDRAN et al., 2012; XUE et al., 2015). Essa exploração e transporte em alto mar tem aumentado dramaticamente os acidentes de derramamento de óleo em oceanos e mares, tais como vazamentos em oleodutos, plataformas de perfuração ou petroleiros de transporte, provocando impactos extremamente prejudiciais para os ecossistemas marinhos (BAO et al., 2012; XU et al., 2013; XUE et al., 2015). Entretanto, grande parte das descargas de petróleo e petroderivados ocorre por lavagens de tanques de navios em alto mar (GOMES, 2004)

Devido ao espalhamento lateral do óleo, há uma grande dificuldade em sua contenção. O petróleo derramado flutua e alastra-se progressivamente, formando extensas manchas negras de efeitos altamente destruidores. Além dos seus efeitos imediatos e bem evidentes, há também os efeitos em longo prazo, com repercussões não menos graves. Quando as marés negras atingem as zonas costeiras colocam em risco a fauna e flora pela intoxicação de peixes, moluscos e mamíferos, representando um perigo para o homem através da cadeia alimentar (JIANG et al., 2010; MONTAGNOLLI, 2011).

Análises estatísticas revelaram que poluição de óleo é responsável por aproximadamente 80% de toda a poluição marinha. O impacto da presença a longo prazo de óleo sobre ecossistema dos oceanos permanece incalculável (HUANG et al., 2013; SIMONS et al., 2013).

Para resolver problemas de derramamentos de óleo em ambientes marinhos, os métodos baseados em contenção física e dispersantes químicos usados para resolver este problema são caros e limitados em eficácia. Portanto, as expectativas por tecnologias ecológicas e inovadoras para a remoção de contaminantes de petróleo têm aumentado (SOOD; LAL, 2009; BAO et al., 2012).

1.2.3.2 Ocorrências de contaminação por petróleo em ambiente marinho

Acidentes com navios são geralmente exemplificados pelo desastre ocorrido com o petroleiro *Exxon Valdez* no Alasca, em 24 de março de 1989, por ter afetado seriamente toda a biota marinha e costeira da região. Estima-se que 11 milhões de galões (42 milhões de litros) de petróleo bruto escaparam através do corte no casco do navio (MONTAGNOLLI, 2011; DAY, 2014).

Em 11 de março de 2009, o *MV Pacific Adventurer* derramou 270 toneladas de óleo ilha Moreton, na Austrália, impactando zonas húmidas, praias e costões rochosos. Quatro anos após o derrame, o processo de recuperação não está completo. Estudos indicam que a recuperação na ilha Moreton está levando mais tempo do que o previsto (FINLAYSON et al., 2015).

Em 15 de abril de 2010, no Golfo do México, um acidente de grande escala foi o derramamento provocado pela explosão da *Deepwater Horizon* da British Petroleum que ocorreu durante três meses. Considerado como o pior desastre ambiental enfrentado pelos Estados Unidos, o vazamento chegou a ser 20 vezes maior que ocorrido em Exxon Valdez. O vazamento foi contido em 15 de julho do mesmo ano, após 4,9 milhões de barris (1 barril é igual a 159 L) serem lançados ao oceano, na taxa de 53.000 barris por dia. O impacto ambiental continua até hoje. Este é considerado o maior vazamento acidental marinho da indústria do petróleo (BBC, 2010; MONTAGNOLLI; 2011).

Também em 2010, em julho, na China, uma explosão no oleoduto em Dalian, causou danos enormes para o mar e a costa. Dois oleodutos explodiram durante o carregamento de um navio-tanque, no Porto de Xingang, um dos maiores da China, despejando 1,5 mil toneladas de óleo no mar. A mancha negra atingiu quase 200 km² (XU et al., 2013).

Exemplos de acidentes com derrames de petróleo no Brasil foram: o derrame de meio milhão de litros de combustível em janeiro de 2001 nas Ilhas Galápagos; o derrame de 4 milhões de litros de petróleo da Refinaria Getúlio Vargas no município de Araucária, no Paraná, em julho de 2000; e o vazamento de 1,3 milhões de litros de combustível em janeiro do mesmo ano na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (MONTAGNOLLI, 2011)

Em 2011 as empresas Chevron e Modec tiveram acidentes em suas operações que causaram derramamentos de petróleo na costa brasileira. O vazamento na Chevron ocorreu na plataforma SEDOC 706, na bacia de Campos, no Rio de Janeiro, de onde estima-se que vazou 3.738 barris por dia, entre 9 e 12 de novembro, que resultou no total de 15 mil barris despejados no oceano (DN GLOBO, 2011).

No caso da Modec, pelo menos 10 mil litros de óleo vazaram do navio *Cidade de São Paulo*, na Baía da Ilha Grande, litoral sul do Estado do Rio, no dia 17 de dezembro de 2011. Apesar da quantidade ter sido bem menor que a da Chevron, o problema maior foi que o vazamento ocorreu em uma região turística que é um berçário para muitas espécies. O fato ocorreu em menos de dois meses após o acidente com a Chevron (CINTRA, 2011)

No dia 26 de janeiro de 2012, um vazamento em uma monobóia da Transpetro derramou no mar 33.600 litros de óleo em Tramandaí (RS). O óleo chegou à costa e deixou a praia bem impactada (Figura 6).

FIGURA 6. Mancha que percorreu 6km e chegou à praia de Tramandaí (RS)

Fonte: MAGS (2012).

1.2.4 Processos de Descontaminação Ambiental

O tratamento pode ocorrer de forma natural, sem depender de intervenção física ou química, como é o caso da evaporação e da fotoxidação ou fotodecomposição (GOMES, 2004). Entretanto, existem métodos físico-químicos frequentemente utilizados e desenvolvimento de protocolos biológicos de descontaminação ambiental (ALI-ZAHRANI, 2010).

1.2.4.1 Processos físicos e químicos

Os métodos físicos são utilizados para o controle dos vazamentos. Estes métodos são utilizados principalmente para prevenir a propagação do óleo. Com esses métodos, as propriedades físicas e químicas do óleo derramado não são alteradas (DAVE; GHALY, 2011). O controle físico de óleo derramado pode ser feito por meio de barreiras, *skimmers* e adsorventes (AL-ZAHRANI, 2010).

Os métodos químicos mais comuns são: neutralização, precipitação, oxidação, extração por solventes e aplicação de surfactantes (GOMES, 2004; ALI-ZAHRANI, 2010). Geralmente a utilização de métodos químicos ocorre por meio de agentes dispersantes que atuam em combinação com métodos físicos. Os dispersantes

incluem surfactantes que são pulverizados sobre a água (ALI-ZAHRANI, 2010; ONUR, 2015).

1.2.4.2 Processo biológico: Biorremediação

Em comparação com métodos físicos e químicos, o tratamento biológico vem se tornando uma alternativa eficiente, econômica e ambientalmente amigável para a remoção da poluição por hidrocarbonetos de ambientes contaminados, reduzindo os danos causados por derrames de petróleo (ZHANG et al., 2011; XU et al., 2013).

A necessidade de remediar áreas poluídas abriu o caminho para o desenvolvimento de novas tecnologias para desintoxicar contaminantes não apenas através de métodos químicos ou físicos, como também através de técnicas biológicas, com destaque para a tecnologia de biorremediação (MHATRE; KUNDE, 2014; SILVA et al., 2015).

A biorremediação é o conjunto de ações e técnicas que baseiam-se na degradação bioquímica dos contaminantes, por meio de agentes biológicos, principalmente micro-organismos, presentes ou adicionados no local da contaminação, para detoxificar as áreas contaminadas, tendo como objetivo principal reduzir, eliminar e até mesmo transformar poluentes orgânicos e inorgânicos, degradando-os em produtos inofensivos, tais como CO₂, H₂O e outros compostos inorgânicos (BERNOTH et al., 2000; STRONG; BURGUESS, 2008; KULSHRESHTHA et al., 2014).

De acordo com o local e a técnica como a biorremediação é conduzida, ela pode ser classificada em:

In-situ ou ***on-site*** - envolvem tratamento de material contaminado no lugar de origem, com a bioestimulação, que se trata do fornecimento de oxigênio e nutrientes para aumentar a atividade metabólica, ou a bioaugmentação que se refere a introdução de certos micro-organismos com conhecida capacidade de degradação que aumentarão a capacidade de remediação no local (SOUZA et al., 2012; SÁENZ-MARTA, et al., 2015).

Ex-situ ou ***off-site*** - são os tratamentos que envolvem a remoção física do material contaminado para o processo de tratamento. São preferidas

frequentemente por apresentarem um custo menor (SOUZA et al., 2012; KUMAR, 2011).

Sua principal vantagem é a extração da maior parte dos contaminantes antes que eles se espalhem. Tem sido utilizada com sucesso no tratamento de água contaminada com poluentes químicos, através de reatores biológicos, tanto sob condições aeróbias e/ou anaeróbias (SOUZA et al., 2012; MOSCOSO, 2012). É uma tecnologia promissora porque existe um maior controle sobre as condições físico-químicas (pH, temperatura, arejamento, etc.), de modo que a atividade do micro-organismo é reforçada (ZOUBOULIS; MOUSSAS, 2011; SILVA et al., 2015).

A remediação de áreas afetadas pelo derramamento de óleo através da utilização de micro-organismos, pode ser uma solução eficaz e de baixo custo, para restaurar o ecossistema (NIAZY et al. 2016). Em particular, no caso de contaminação com hidrocarbonetos pesados, biorremediação *ex-situ* em biorreator adequadamente projetado e controlado, demonstra ser um processo eficaz em remover a maioria dos contaminantes, utilizando o potencial de biodegradação dos micro-organismos (NIKAKHTARI et al., 2010).

1.2.4.2.1 Biodegradação por micro-organismos

Estudos têm sido realizados sobre o potencial da biorremediação através de micro-organismos, porque eles desempenham um papel importante no meio ambiente quando ocorrem contaminações (XU et al., 2013; MHATRE; KUNDE, 2014; SILVA, 2015; ONUR, 2015). A biorremediação, através da técnica da biodegradação utilizando micro-organismos, é o processo que ocorre quando substâncias são quebradas por processos enzimáticos destes (DIAZ, 2008; MONTAGNOLLI, 2011).

Populações nativas presentes nos locais contaminados estão certamente adaptadas às condições climáticas, físico-químicas e nutricionais. Entretanto, estas comunidades frequentemente não incluem espécies com habilidades enzimáticas necessárias para permitir que a biorremediação prossiga em alta taxas, resultando em processos de longo tempo (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008).

Biodegradação consiste na eliminação de compostos orgânicos pela atividade metabólica dos micro-organismos presentes no local onde está a substância a ser biodegradada. Em teoria, se o processo for 100% eficiente, os produtos finais da biodegradação, serão apenas CO₂ e H₂O (MONTAGNOLLI, 2011). Neste caso, a biodegradação é denominada mineralização. Diante disso, a identificação de micro-organismos-chaves em processos de degradação de poluentes é fundamental para o sucesso no desenvolvimento de estratégias de biorremediação ótimas. Ou seja, para que haja uma efetiva biotransformação/biodegradação/mineralização do poluente (COHEN, 2002; PRIYA et al., 2015, ANDREOLLI et al., 2016).

Existe uma estratégia de ocorrência natural que se inicia logo após uma contaminação. São os processos metabólicos realizados pelos micro-organismos autóctones, ou seja, do próprio local, que atuam quando há contaminação, sem qualquer interferência de outras tecnologias ativas de remediação conhecida. Esse processo é denominado de *atenuação natural*.

Entretanto, existem duas estratégias que otimizam esse processo de biorremediação microbiana pela biodegradação (BENTO et al., 2005; PRIYA et al., 2015):

- I. Adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e surfactantes, processo conhecido como bioestimulação;
- II. Inoculação de consórcios microbianos com potencial degradador conhecido, para suplementar a microbiota local, processo denominado de bioaugmentação.

Fontes de nutrientes devem ser usadas em concentrações limitadas para que não haja inibição do crescimento microbiano e nem aumento do custo do processo. As fontes mais comuns de nutrientes são sais de fósforo e nitrogênio. A adição de nutrientes é feita de modo a se estabelecer relações carbono e nitrogênio (C:N) e/ou carbono e fósforo (C:P) adequadas às atividades metabólicas dos micro-organismos, favorecendo a biodegradação (HAMDI et al., 2007; MONTAGNOLLI, 2011).

A *bioestimulação* com a adição de nutrientes tem sido uma estratégia amplamente praticada na biorremediação e está bem documentada que este método

muitas vezes aumenta significativamente a degradação do óleo (MOHAJERI et al., 2010; CHEN et al., 2012; PRIYA et al., 2015).

A biodegradabilidade e a toxicidade são dois critérios básicos para se determinar o comportamento de substâncias no ambiente. Alguns autores determinam escalas de intensidade de biodegradação (MONTAGNOLLI, 2011). Aluyor et al., (2009) referem-se a biodegradação mesmo que haja uma mínima transformação que altere as características físico-químicas de uma molécula.

Em se tratando de biodegradação de hidrocarbonetos, é necessário desenvolver estudos em escalas de frascos, bancada e piloto, a fim de se estabelecer a eficiência degradadora de uma cultura microbiana (PRIYA et al., 2015).

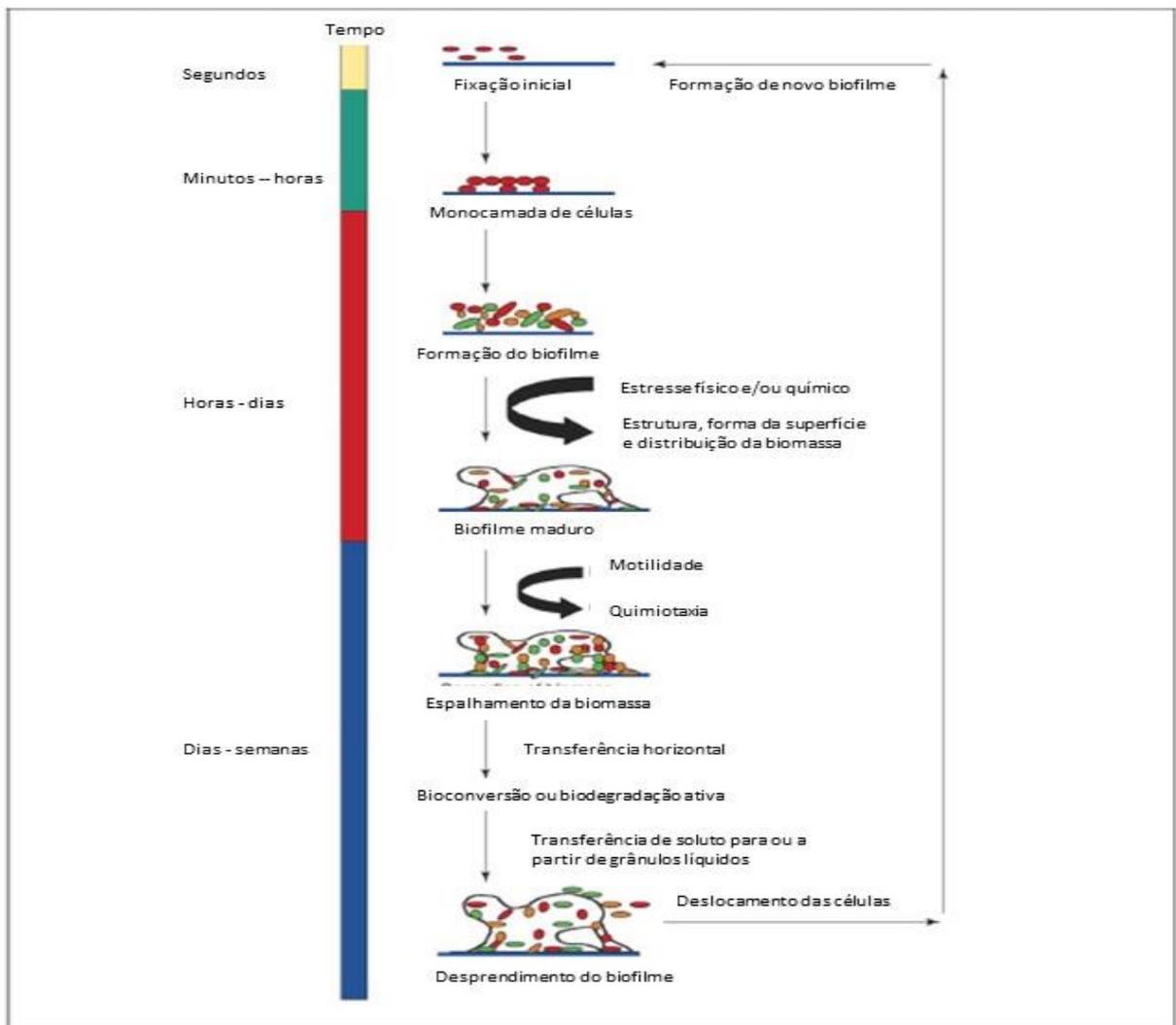
Quando há a presença de compostos recalcitrantes no processo de biodegradação, alguns micro-organismos produzem biofilmes formados por polímeros que garantem sua adesão na superfície em torno dos compostos, para metabolizá-los. Algumas bactérias e fungos são especializados na formação de biofilmes, o que garante a adesão, por exemplo, no caso de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), facilitando a sua degradação (JONHSEN et al., 2005; SINGH et al., 2006).

Biofilmes são conjuntos de um único micro-organismo ou múltiplas populações de micro-organismos que estão ligados a superfícies através de substâncias poliméricas extracelulares. Células em um biofilme têm uma melhor possibilidade de adaptação e sobrevivência (especialmente durante situações de stress), pois estão protegidas dentro de uma matriz. Sistemas de biofilmes são especialmente adequados para o tratamento compostos de recalcitrantes devido à sua elevada biomassa microbiana e capacidade para imobilizar esses compostos (Singh et al., 2006).

A formação de um biofilme ativo envolve etapas cíclicas. Inicialmente as células inoculadas são espalhadas por interações físico-químicas e ao entrarem em contato com a superfície abiótica e passam para quimiotaxia, proliferando-se, anexando outras células, formando o biofilme. O desenvolvimento ou distorção do biofilme é influenciado pelos fatores ambientais, como a hidrodinâmica, os estresses químico e mecânico. As células no biofilme maduro levam a propagação de

biomassa pelo aumento da transferência vertical ou horizontal. Eventualmente ocorre o desprendimento eventual biofilme. Os processos de formação e desprendimento de células são repetidos num ciclo, permitindo assim a continuação do desenvolvimento dos biofilmes semelhantes, que podem subsequentemente alcançar novas dimensões como resultado de influências ambientais. Esse processo pode elevar a taxa de descontaminação em processos de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo (SINGH et al., 2006). A figura 7 mostra uma representação esquemática das etapas envolvidas na formação de um biofilme ativo.

FIGURA 7. Representação esquemática das etapas envolvidas na formação de um biofilme ativo



Fonte: SINGH et al., (2006).

1.2.4.2.2 Vias e mecanismos de degradação do petróleo por micro-organismos

Geralmente, os compostos do petróleo são biodegradados, seguido por três processos. Em primeiro lugar, compostos de petróleo são absorvidos na superfície microbiana; em segundo lugar, estes compostos de petróleo são transferidos para membrana de células microbianas; em seguida, estes compostos são degradados na célula microbiana. Por fim, estes compostos são degradados em várias moléculas pequenas por micro-organismos (ATLAS, 1995).

Muitas pesquisas têm mostrado que a forma de degradação de todos os tipos de componentes de petróleo (alcanos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc.) é um processo de oxidação (BLUMER et al., 1973; ATLAS, 1995; ROBADOR et al., 2009). No entanto, as vias de degradação destes compostos são diferentes, devido às diferentes estruturas de componentes de petróleo, tais como saturado, aromático, resina, asfalteno e frações de hidrocarbonetos (XUE et al., 2015).

1.2.5 Biodegradação de hidrocarbonetos de diesel

Existem vários métodos para testar a biodegradabilidade das substâncias. A biodegradabilidade é conhecida ao seguir os parâmetros indicativos do consumo da substância estudada pelos micro-organismos. Isso pode ser detectado pela produção de compostos básicos resultantes da degradação ou mineralização da amostra. Um desses métodos é a alteração nas bandas de infravermelho em hidrocarbonetos (ALUYOR et al., 2009; MONTAGNOLLI, 2011).

1.2.5.1 Fatores que Influenciam na Biodegradação

No caso de biorremediação, através da biodegradação microbiana em locais contaminados por derivados de petróleo, estudos realizados por Kennish (1996), Gomes (2004), Bento et al., (2005) e Niazy et al., (2016), demonstraram que as taxas de biodegradação do óleo são influenciadas principalmente pela temperatura, pH, níveis de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e salinidade, confirmando os

trabalhos anteriormente realizados por Atlas e Bartha (1972) e Atlas (1981). A tabela 3 relaciona os principais fatores que afetam o processo de biodegradação, que quando otimizados, possibilitam um melhor desempenho dos micro-organismos na biodegradação.

TABELA 3. Principais fatores que afetam a biodegradação

Fator	Influência
Temperatura	Reflete na fisiologia do micro-organismo Efeito direto na química dos poluentes Altera a viscosidade do óleo
pH	Pode influenciar na solubilidade dos contaminantes Valores extremos inibem processos de degradação
Oxigênio	Condições aeróbias são necessárias para a degradação de hidrocarbonetos Em alguns casos pode ocorrer degradação em processo anaeróbio
Nutrientes	Essenciais ao crescimento celular Precisam manter boa relação com o carbono
Salinidade	Alta salinidade pode afetar negativamente a atividade microbiana Fungos resistem menos às altas condições de salinidade do que bactérias

Fonte: GOMES (2004), BENTO et al., (2005), SIHAG et al., (2014)

A concentração do óleo e a sua composição também influenciam na biodegradação, onde as frações mais facilmente degradadas por micro-organismos em ordem decrescente de susceptibilidade são: n-alcenos, alcenos ramificados, aromáticos de baixo peso molecular e alcenos cíclicos, respectivamente (SIHAG et al., 2014). Na tabela 4 estão representados o nível de biodegradabilidade de alguns derivados do petróleo de acordo com os hidrocarbonetos constituintes.

TABELA 4. Nível de biodegradabilidade de alguns constituintes de petroderivados.

Biodegradabilidade	Exemplo de Constituintes	Derivados onde os constituintes são encontrados
 <p>Mais biodegradável</p> <p>Menos biodegradáveis</p>	n-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, Dimetilpenteno	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decano	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis (aquecimento)
	Tetradecanos	Óleos lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis (aquecimento)
	Acenafteos	Óleos lubrificantes

Fonte: SILVA (2012)

Além dos fatores que influenciam o processo de biodegradação já mencionados, para que o processo seja bem sucedido, é necessário que os compostos poluentes estejam disponíveis aos micro-organismos, para que haja a ação microbiana. A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo ocorre em um sistema multifásico (matéria orgânica insolúvel, água, sais e micro-organismos). A interface água-óleo é bastante distinta, devido a imiscibilidade das fases aquosa e oleosa (GOMES, 2004).

Existem três mecanismos através dos quais se explica a assimilação de hidrocarbonetos. Estes mecanismos tentam explicar a forma como o hidrocarboneto é transferido do ambiente para à superfície da célula, e depois é transportada através da membrana para regiões intracelulares por ação enzimática (URURAHY, 1998; GOMES, 2004). Tais mecanismos são:

a) Utilização do composto apenas na fase aquosa

O micro-organismo apenas consegue utilizar moléculas dissolvidas na fase aquosa. O crescimento microbiano (decorrente da degradação do óleo) está condicionado à disponibilidade do composto a estes micro-organismos, que presumivelmente não são produtores de biossurfactantes.

b) Contato direto dos micro-organismos com a fase oleosa

O micro-organismo adere diretamente à superfície oleosa e metaboliza seus constituintes. Micro-organismos que crescem em hidrocarbonetos em solução aquosa, frequentemente se fixam ao substrato orgânico, sendo este, pré-requisito à biodegradação.

c) Produção e excreção de subprodutos que induzem a partição da fase oleosa em microgotículas

Alguns micro-organismos são capazes de utilizar óleo como fonte de alimento, degradando assim, vários tipos de hidrocarbonetos de cadeias curtas, cadeias longas e compostos aromáticos. Para isso, muitos deles produzem compostos surfactantes potentes que podem emulsionar o óleo em água, tornando-o disponível e facilitar a sua assimilação e remoção (ATLAS, 1984; MUELLER, 1996; KUMAR et al., 2011; HUANG et al., 2013).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que se acumulam nas interfaces, diminuem as tensões interfaciais e formam estruturas agregadas, como micelas. Os surfactantes produzidos e excretados por micro-organismos que são capazes de aumentar a taxa de consumo do substrato oleoso, alterando a superfície da molécula, ocasionando o aumento no coeficiente de partição da fase oleosa para a fase aquosa, de modo que o óleo possa ser absorvido, potencializando a taxa de biodegradação, são chamados de biosurfactantes ou bioemulsificantes (MAKKAR; ROCKNE, 2003; GOMES, 2004; SÁENZ-MARTA, et al., 2015). Diversos exemplos de biosurfactantes e/ou bioemulsificantes produzidos por leveduras e bactérias (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984; COOPER; GOLDENBERG, 1984; VANCE-HARROP et al., 2003; MANEERAT, 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006, ABBASI et al., 2012; SOUZA et al., 2012; RUFINO et al., 2014, SÁENZ-MARTA, et al., 2015) encontram-se disponíveis na literatura.

Biosurfactantes têm vantagens sobre os seus homólogos químicos porque eles são biodegradáveis, têm baixa toxicidade, são eficazes em temperaturas extremas ou valores extremos de pH e apresentam melhor compatibilidade ambiental (MENEZES et al., 2011; ZHENG et al., 2012). Geralmente apresentam na

estrutura glicolipídios, lipopeptídios, complexos polissacarídeo-proteína, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (DAS; MUKHERJEE, 2007; MONTAGNOLLI, 2011).

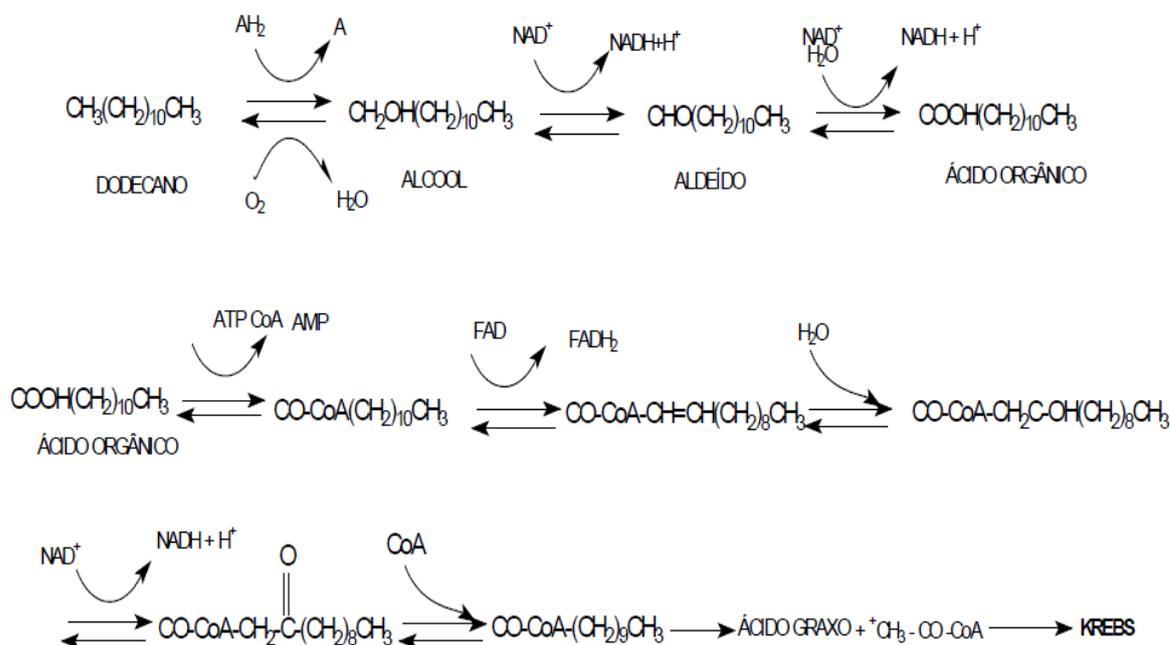
No que diz respeito ao mecanismo de ação, os compostos biossurfactantes são melhores em diminuir a tensão superficial, e os bioemulsificantes são capazes de produzir emulsões estáveis (SÁENZ-MARTA et al., 2015).

1.2.5.2 Aspectos bioquímicos da biodegradação de hidrocarbonetos

De acordo com Gomes (2004), alguns aspectos bioquímicos importantes devem ser considerados em um processo de biodegradação de hidrocarbonetos. São eles:

- I. Hidrocarbonetos alifáticos são geralmente mais facilmente degradados;
- II. Alifáticos de cadeia normal são mais fáceis de serem biodegradados que os de cadeia ramificada;
- III. Saturados são mais suscetíveis à degradação que os insaturados;
- IV. Alifáticos de cadeia longa são mais facilmente degradados que os de cadeia curta.

Os alcanos de cadeia normal são degradados primariamente por oxidação do grupo metil terminal, seguido de uma clivagem da molécula na região entre o segundo e o terceiro carbono da cadeia. A reação do grupo metil envolve a ação direta do oxigênio ao carbono terminal do hidrocarboneto, mediada por uma classe de enzimas chamadas oxigenases. A adição do oxigênio ao carbono primário promove a formação de um álcool primário, que é oxidado a aldeído e por fim, transformado em ácido graxo. Um fragmento longo de dois carbonos terminais é clivado produzindo o acetil CoA, que entra na via metabólica do ciclo de Krebs. Uma repetição sequencial destas reações resulta na completa oxidação da molécula de hidrocarboneto (BAKER; HERSON, 1994; GOMES, 2004). Na figura 8, observa-se a via de degradação de alcanos, com a sequência das reações.

FIGURA 8. Sequencia de reações durante a degradação de n-alcanos

Fonte: BAKER; HERSON (1994)

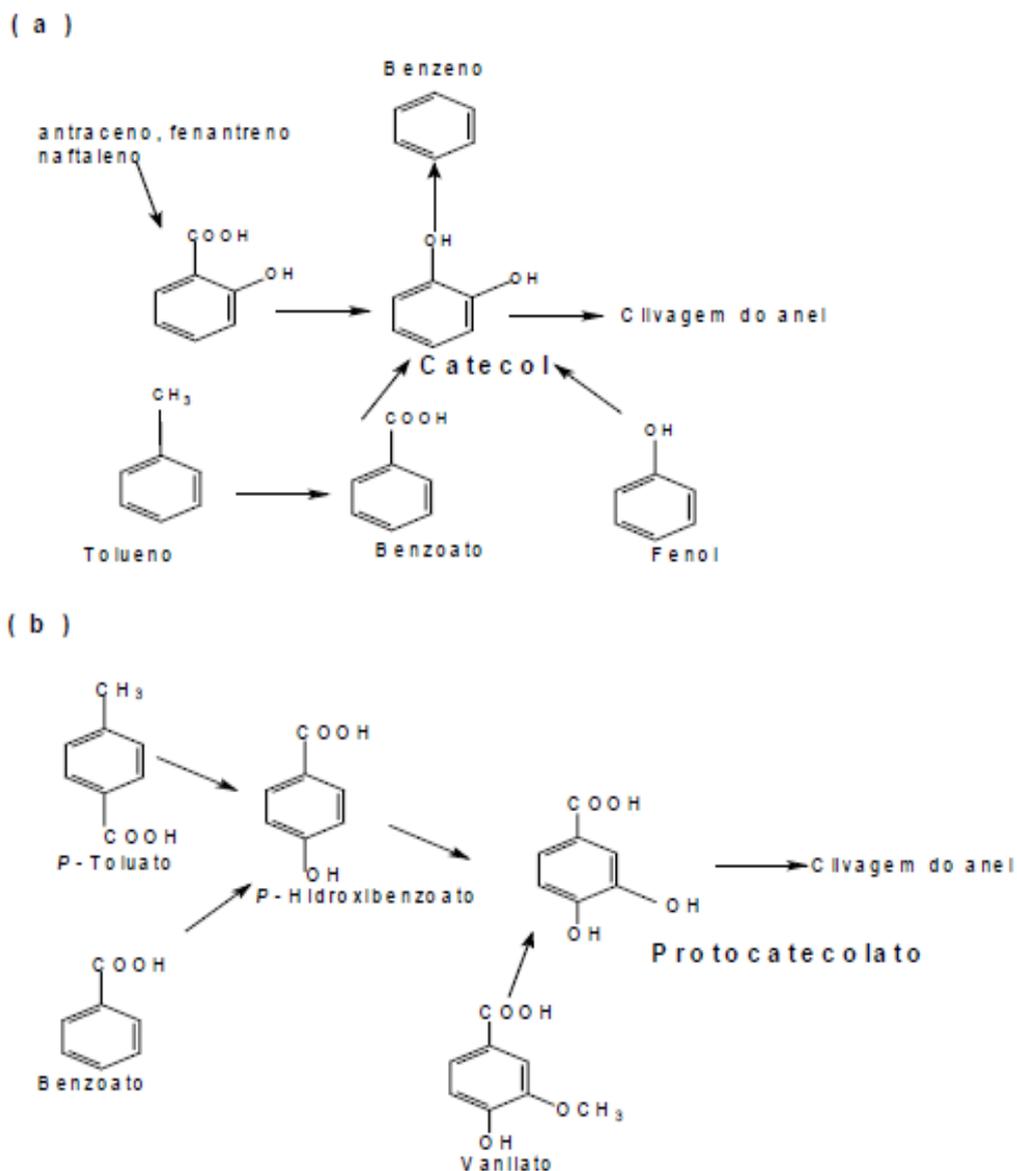
A oxidação de hidrocarbonetos alifáticos insaturados não ocorre da mesma forma que a dos alcanos. Por conter dupla ligação no carbono terminal, proporciona vários mecanismos de ataque e diversas maneiras de degradação pelos micro-organismos (GOMES, 2004). Da mesma forma ocorre com o benzeno, que possui um grande número de vias metabólicas envolvidas, por conter diversas frações pesadas (GOMES, 2004).

O benzeno é degradado primeiro pela conversão em catecol ou protocatecolato. O núcleo aromático nesses compostos é aberto por via da ortoclivagem ou pela metaclivagem. A ortoclivagem envolve a clivagem de catecol entre dois grupos hidroxil, levando a formação de muconato e mucolactona, os quais são metabolizados a 4-oxadipato enol-lactona e depois ao 3-oxiadipato, procedendo à formação do acetil-CoA e succinato. Na metaclivagem, entretanto, a clivagem ocorre adjacente ao grupo hidroxil, formando semi-aldeído 2-hidroxil-mucônico, como produto inicial da clivagem do anel. Subsequentemente a orto e metaclivagem

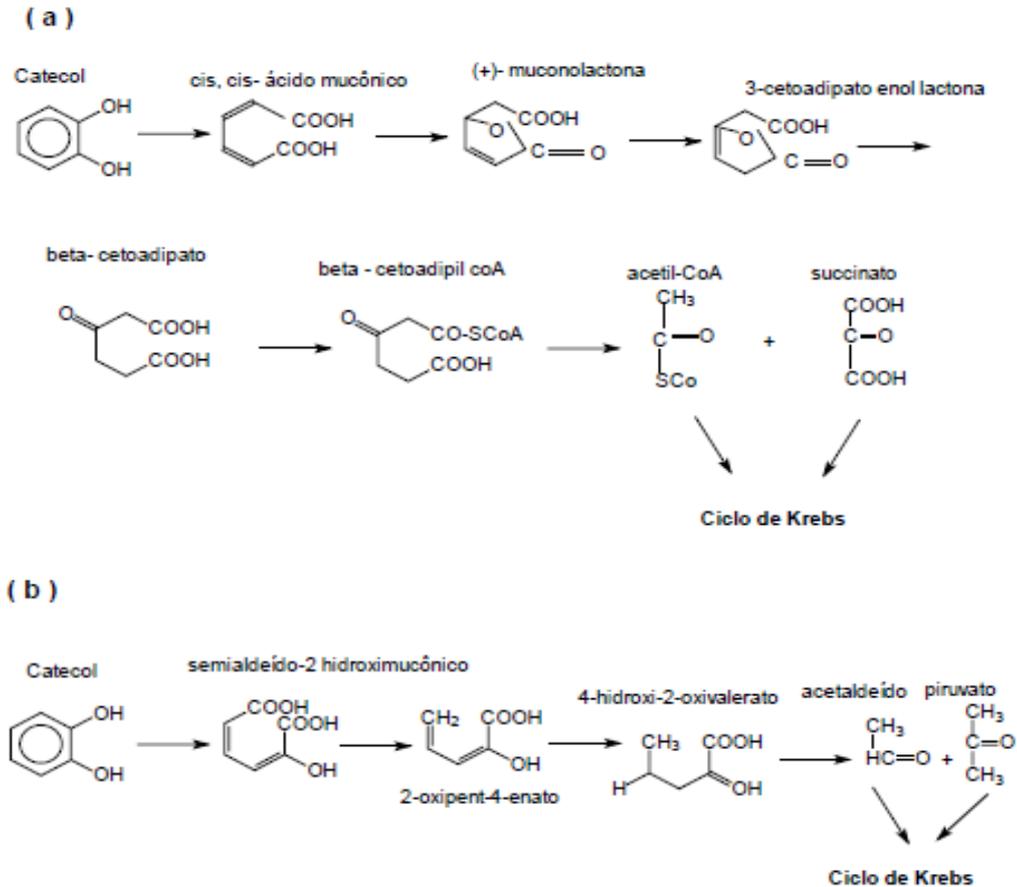
do anel aromático, procede-se à formação de piruvato, formiato e acetaldeído, que vão para o ciclo de Krebs (BAKER; HERSON, 1994; GOMES, 2004).

A figura 9 representa a sequência para formação do catecol e protocatecolato, durante a degradação de benzeno e poli-aromáticos e a figura 10 representa os esquemas das reações de orto e metaclivagem do anel aromático.

FIGURA 9. Sequência de formação do catecol (a) e protocatecolato (b) durante a degradação do benzeno



Fonte: BAKER; HERSON (1994); GOMES (2004).

FIGURA 10. Ortoclivagem (a) e metaclivagem (b) do anel aromático

Fonte: BAKER; HERSON (1994); GOMES (2004).

1.2.6 Água do Mar

As águas dos mares e oceanos são constituídas basicamente de uma mistura complexa de sais que possibilitam a manutenção de milhões de formas de vida. (PEREIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

A água do mar contém quase todos os elementos, do hidrogênio ao urânio, e é composta por 96,7% de água e 3,3% de sais dissolvidos. Sua densidade na superfície varia de 1020 a 1029 kg m⁻³, dependendo da temperatura e salinidade. Em oceano profundo pode chegar a 1050 kg m⁻³ ou superior. O pH é limitado ao intervalo de 7,5 a 8,4. A salinidade da água do mar gira em torno de 35 ppt, também expresso como 35‰ (MATSUURA et al., 2001; SOUZA et al., 2012).

Devido ao excelente conteúdo em sais minerais, a água do mar tem sido empregada para o crescimento de micro-organismos degradadores de petróleo e seus derivados, como também para produção de metabólitos utilizados para minimizar a contaminação causada pelo derramamento de óleos nos oceanos (VANCE-HARROP et al., 2003; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2002; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2006; SOUZA et al., 2012).

1.2.6.1 Biodegradação de petróleo e derivados em água do mar

Desde meados do século passado, a utilização de micro-organismos de degradação de petróleo para biorremediação de petróleo derramado tem sido amplamente divulgado (TORRES et al., 2008; STALEY, 2010; LIU et al., 2014; XUE et al., 2015).

Em se tratando de ambiente marinho, normalmente, o fator limitante para a degradação microbiana do óleo é a concentração de nutrientes inorgânicos, em particular, nitrogênio e fósforo (MOHAJERI et al., 2010; CHEN et al., 2012).

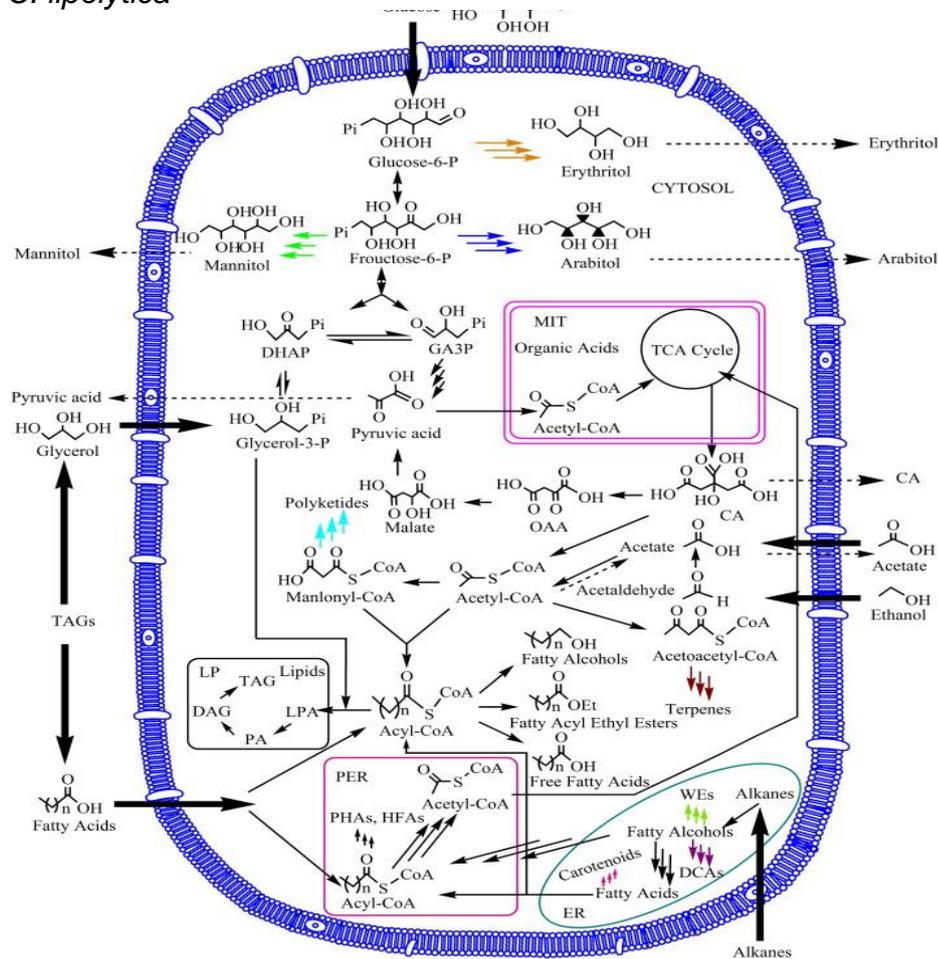
A água do mar utilizada para formulação de meios de cultivos para desenvolvimento de micro-organismos favorece o seu crescimento de forma seletiva e reduz riscos de contaminação, além de proporcionar minerais e nutrientes (SOUZA et al., 2012).

1.2.7 *Candida lipolytica*

A *Candida lipolytica*, denominação original da *Yarrowia lipolytica*, é um micro-organismo aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetos, subclasse Hemiascomycetos (BARTH; GAILLARDIN, 1997, BOURDICHON et al., 2012). A espécie foi originalmente classificada como *Candida lipolytica*, no final dos anos 1960, desde que nenhum estado sexual tinha sido descrito. A forma perfeita foi reclassificada primeiro como *Endomycopsis lipolytica*, depois como *Saccharomycopsis lipolytica* e finalmente como *Yarrowia lipolytica* (BARTH; GAILLARDIN, 1997; LIU; JI; HUANG, 2015).

Como uma levedura não convencional, a *C. lipolytica* pode assimilar e fermentar diferentes fontes de carbono, tais como materiais hidrofílicos (glicose, glicerol, álcoois e etila) e substratos hidrofóbicos (ácidos graxos, triglicerídeos e alcanos) e produzir metabolitos importantes (LIU; JI; HUANG, 2015). Os processos metabólicos da *C. lipolytica* cultivadas nas fontes de carbono mais comuns, tais como glicose, glicerol, etanol, acetato, ácidos graxos, alcanos e triacilgliceróis são ilustrados na Figura 11.

FIGURA 11. Vias metabólicas de assimilação de fontes típicas de carbono no cultivo de *C. lipolytica*



Fonte: LIU, JI, HUANG (2015)

Abreviaturas: RE: retículo endoplasmático; PER: peroxissoma; MIT: mitocôndrias; Ciclo do TCA: ciclo-tricarboxílico ácido; LP: corpo de lípidios; DHAP: fosfato de di-hidroxiacetona; GA3P: glicerol-3-fosfato; CA: ácido cítrico; OAA: oxaloacetato; PA: ácido fosfatídico; LPA: ácido lisofosfatídico; DAG: diacilglicerol; TAG: triacilglicerol; DCAs: ácidos carboxílicos; PHAs: poli-hidroxiálcanoatos; HFAs: ácidos graxos hidroxilados; EVs: ésteres de cera.

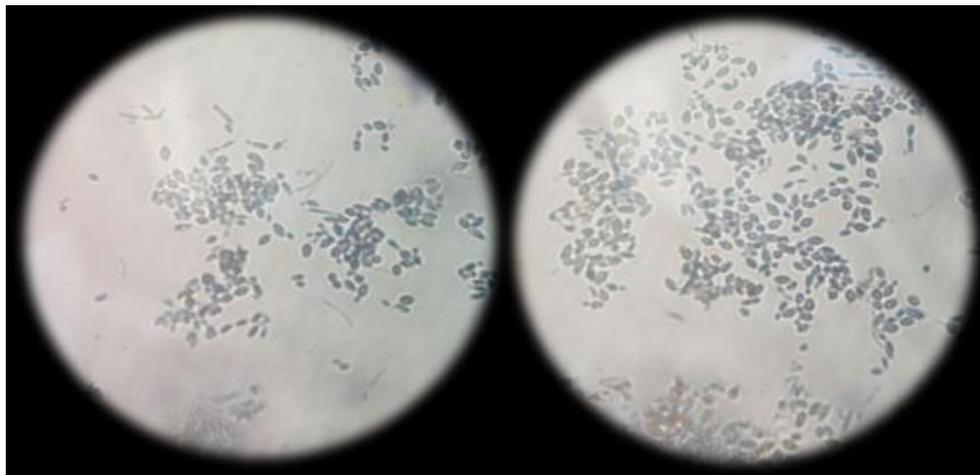
A *C. lipolytica* tem atraído atenção e tem sido uma espécie microbiana muito estudada (SOUZA et al., 2009; CAMPOS, 2013; ZINJARDE et al., 2014; CSUTAK et al., 2015), devido a seu grande potencial biotecnológico e aplicações na produção de ácidos graxos, bioemulsionantes, biossurfactantes, tratamento de águas residuais e na degradação de poluentes, tais como hidrocarbonetos (LEDESMA-AMARO et al., 2016).

A capacidade que as leveduras do gênero *Candida* tem para crescer em meio com hidrocarbonetos como única fonte de carbono, é indicativa da sua capacidade em utilizá-los (SOOD et al., 2009). A *C. lipolytica* utiliza hidrocarbonetos por possuir vias metabólicas necessárias para a utilização (ZINJARDE et al., 2014). O crescimento desse gênero microbiano em óleo diesel como única fonte de carbono e energia, indica a sua capacidade de degradá-lo (SOOD et al., 2009; KUMARI; ABRAHAM, 2011).

A incidência frequente da *C. lipolytica* em solos e ambientes marinhos contaminados com óleo, demonstra seu papel importante da desintoxicação de hidrocarbonetos, mesmo sob condições naturais. Com a adição de nutrientes e/ou a conjugação com outros micro-organismos, a capacidade de degradação pode ser aumentada. Além disso, algumas estirpes têm sido excepcionalmente versáteis no que diz respeito às suas interações com os poluentes e podem ser projetadas como principais agentes no desenvolvimento de futuras tecnologias (ZINJARDE et al., 2014).

Trabalhos com *C. lipolytica* UCP 0988 crescendo em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, utilizando como fonte de carbono óleos vegetais como óleo de babaçu (VANCE-HARROP et al., 2003) ou óleo milho (ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2006) ou derivados de petróleo, como óleo diesel (SOUZA et al., 2012; SEGER et al., 2013) ou querosene (SILVA, 2012) - têm ratificado o potencial desta levedura produzir tanto em condições ótimas quanto em condições extremamente adversas, bioprodutos (bioemulsificantes, biossurfactantes e enzimas) de grande interesse científico, comercial e ambiental.

A figura 12 apresenta a *C. lipolytica* UCP 0988 utilizada no presente estudo de biodegradação de óleo diesel em água do mar.

FIGURA 12. *C. lipolytica* UCP 0988

Fonte: O autor (2016)

1.2.7.1. Metabolismo de alcanos por *Candida lipolytica*

Os mecanismos de transporte e de assimilação de alcanos pela *C. lipolytica* ainda não são totalmente conhecidos. Geralmente, dois modelos que incluem um processo por difusão passiva e um mecanismo ativo e dependente de energia ocorrem em *C. lipolytica*. Sabe-se que existe um mecanismo de absorção de alcano, dependente do comprimento da cadeia, que discrimina entre alcanos de cadeia de carbono curta (C_{10} ou C_{12}) e alcanos de cadeia de carbono longa (C_{14} ou C_{16}). Normalmente, alcanos com cadeias mais curtas, de C_5 a C_{10} , não podem ser assimilados porque eles são citotóxicos e simplesmente rompem a membrana celular (THEVENIEAU et al., 2007; LIU; JI; HUANG, 2015).

É geralmente suposto que os alcanos são primeiro convertidos nos álcoois graxos correspondentes, de mesmo comprimento de cadeia, pelo sistema de alcano mono-oxigenases, que é composto de um citocromo P450 e de um NADPH-citocromo 450 redutase ou seja de um citocromo 450 redutase dependente de NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase - Fosfato Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina). Então, os álcoois graxos de cadeia longa são convertidos nos aldeídos graxos correspondentes de mesmo comprimento de cadeia pela álcool-oxidase de cadeia longa, no retículo endoplasmático e os aldeídos graxos correspondentes são convertidos em ácidos graxos de mesmo

comprimento de cadeia pela desidrogenase de aldeído graxo no retículo endoplasmático. Entretanto, os álcoois graxos de cadeia curta no retículo endoplasmático podem ser transportados diretamente para o peroxissoma e são finalmente convertidos em ácidos graxos correspondentes do mesmo comprimento de cadeia (THEVENIEAU, 2010; LIU; JI; HUANG, 2015).

Recentemente, os membros da família *redutase* demonstraram ser proteínas que atuam como fatores de transcrição e têm papéis potenciais na degradação e assimilação de alcanos por *C. lipolytica* (HIRAKAWA et al., 2009; LIU; JI; HUANG, 2015).

No metabolismo, os ácidos graxos de cadeia curta são convertidos em acetil-CoA no peroxissoma, ao passo que os ácidos graxos de cadeia longa são convertidos primeiro em acetil-CoA no citosol, sendo, em seguida, transportados para o peroxissoma ou utilizados como substratos para a síntese de lipídeos. Após o metabolismo dos alcanos, notavelmente, a *C. lipolytica* pode assimilar e utilizar álcoois e aldeídos de cadeia longa como substratos de carbono diretamente a partir de um meio de cultura (LIU; JI; HUANG, 2015).

Com base em reações metabólicas complexas e devido a sua capacidade inerente de produzir múltiplas enzimas, a *C. lipolytica* pode destoxificar poluentes ambientais perigosos, como por exemplo, fenol e bifenila (ZINJARDE et al., 2014; LIU; JI; HUANG, 2015).

Quando cultivada em meios com substratos hidrofóbicos, durante o metabolismo celular, a *C. lipolytica* pode produzir compostos biossurfactantes capazes de acelerar a degradação e assimilação desses substratos (LIU; JI; HUANG, 2015).

1.2.7.2 Produção de biossurfactantes por *C. lipolytica*

Biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos por micro-organismos vêm despertando grande interesse, principalmente para aplicações em biorremediação de solos, oceanos e mares poluídos por petróleo. Muitas espécies de leveduras, bactérias e fungos filamentosos podem degradar petróleo, inclusive algumas cepas de *C. lipolytica*, que tem apresentado, de acordo com a literatura, excelentes

resultados na degradação da porção alifática do petróleo bruto (ZINJARDE et al., 1998; MANEERAT, 2005).

Geralmente, *C. lipolytica* cultivadas em materiais hidrofóbicos, tais como, resíduos de óleo vegetal, resíduos de gorduras industriais e alcanos, podem produzir compostos biossurfactantes ou bioemulsificantes (LIU; JI; HUANG, 2015). Um bioemulsificante, chamado Liposan, o qual é composto principalmente por hidrato de carbono e proteína, foi produzido por *C. lipolytica* cultivadas em substratos de carbono não miscível com a água (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985; LIU; JI; HUANG, 2015). Em outro estudo, cultivada em meio de cultura à base de glicose, a *C. lipolytica* (IMUFRJ50682) produziu um bioemulsificante com alta emulsificação, o qual foi chamado de Yansan (AMARAL et al., 2006; LIU; JI; HUANG, 2015). Outro biotensioativo, que é um agente antimicrobiano e antiadesivo, denominado Rufisan, foi produzido por *C. lipolytica* UCP0988 com um alto rendimento, aproximadamente 4,5 g / L, quando esta estirpe foi cultivada em meio suplementado com resíduos de refinaria de óleo de soja (RUFINO et al., 2011; LIU; JI; HUANG, 2015).

A produção de biossurfactantes e bioemulsificantes é afetada por muitos fatores, tais como a fonte de carbono, oxigênio e pH (LIU; JI; HUANG, 2015). Produção de biossurfactantes e bioemulsificantes associada a utilização de óleos vegetais (VANCE-HARROP et al., 2003; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2006) ou de derivados de petróleo, como querosene e óleo diesel (SOUZA et al., 2012; SILVA, 2012; SEGER et al., 2013), por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar também tem sido verificada em diferentes condições operacionais.

A otimização e a ampliação de escala são etapas importantes para tornar os processos de produção de biossurfactantes/bioemulsificantes mais eficientes e competitivos do ponto de vista econômico. Otimização estatística de componentes de meios de produção de bioemulsificantes por *C. lipolytica* foi realizada por Albuquerque et al., (2006a) usando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. Um modelo matemático para representar a atividade de emulsificação como função das concentrações de uréia, sulfato de potássio e fosfato de amônio foi proposto (ALBUQUERQUE et al., 2006a). De acordo com o modelo, as concentrações de uréia, sulfato de amônio e fosfato de potássio, necessárias para atingir a atividade de emulsificação máxima (4,415 UAE), foram

respectivamente iguais a 0,544; 2,131 e 2,628 % (p/v). A validação do modelo foi realizada sob as condições do meio otimizado. A otimização aumentou a atividade de emulsificação (1,198 UAE) do processo padrão de produção de bioemulsificante em 262,8% nas condições do ponto central do planejamento experimental e em 272% nas condições otimizadas do meio de produção.

Ampliação de processo de produção de biossurfactante por *C. lipolytica* UCP 0988 da escala de frasco para escala de biorreator de 5 litros, foi realizada por Albuquerque (2006). Nos experimentos em escala ampliada, empregou-se o meio de baixo custo, a base de água do mar diluída a 50% (v/v), desenvolvido e otimizado por Albuquerque (2006). Nas faixas de temperatura e agitação estudadas, para obter-se altas atividades de emulsificações para emulsões água-em-hexadecano, água-em-óleo de milho e água-em-óleo de canola, a melhor condição operacional de temperatura e agitação foi 28°C e 300 rpm.

Neste contexto, novas pesquisas precisam ser desenvolvidas para ampliar os conhecimentos técnico-científicos sobre os potenciais, limitações e aplicações de *C. lipolytica* UCP0988 em processos de biodegradação (desde a escala de frascos até a escala industrial) de petróleo e derivados associados a produção de bioprodutos ambientalmente amigáveis e com alto valor agregado

REFERÊNCIAS

- ABBASI, H. et al. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 211-219, 2012.
- AGARRY, A., LATINWO, G. K. Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents. **Journal of Ecological Engineering**, v. 16, n. 2, 2015.
- ALBUQUERQUE, C. D. C; FILETTI, A. MF; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 575-583, 2006.
- AL-FARAAS, A. et al. Isolation of Dibenzothiophene Utilizing Bacteria and Determining the Optimal Conditions for Utilizing by P13 Isolate. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 49, 2016.
- ALMQUIST, Joachim et al. Kinetic models in industrial biotechnology—improving cell factory performance. **Metabolic engineering**, v. 24, p. 38-60, 2014.
- ALUYOR, E. O. et al. Biodegradation of vegetable oils: A review. **Scientific Research and Essay**, v. 4, n. 6, p. 543-548, 2009.
- AL-ZAHRANI, A.A., IDRIS, G.M.A. Biological Treatment of Hydrocarbon Contaminants: Petroleum Hydrocarbon uptake by *Pseudomonas alkanolytica*, **Eng. Sci.**, v. 21, n. 1, p. 39-53, 2010.
- AMARAL, P. F. F. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894-1898, 2006.
- AMEEN, F., MOSLEN, M., HADI, S. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia, Saudi Journal of Biological Sciences, In Press, **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.
- ANDRADE, J. A., AUGUSTO, F., JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Ecletica Química**, v. 35, n. 3. São Paulo, p. 17-43, 2010.
- ANDREOLLI, Marco et al. Bioremediation of diesel contamination at an underground storage tank site: a spatial analysis of the microbial community. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2016.

ANNES, M. H. F. IBAMA, **Fepam e Marinha do Brasil divulgam laudo técnico de vazamento de óleo em Tramandaí**. 2012. Ascom - Ibama/RS. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/publicadas/ibama-fepam-e-marinha-do-brasil-divulgam-laudo-tecnico-de-vazamento-de-oleo-em-tramandai>>. Acesso em: 05 abr. 2012.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorous. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, n. 3, p. 309-318, 1972.

_____. The microbiology of aquatic oil spills. **Advances Applied Microbiology**, v. 22, p. 225-266, 1977.

ATLAS, R.M. Pathways of microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v.45, n.1, p. 180-209, 1981.

_____. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 178-182, 1995.

BAART, G.J.E. et al., Scale-up for bulk production of vaccine against meningococcal disease. **Vaccine**, v.25, p. 6399 -6488, 2007.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2 ed. Porto Alegre : Bookman, 622 p., 2002.

BAKER, K.H, HERSON, S. Biorremediation. New York, McGraw-Hill, inc. 375 p., 1994.

BALACHANDRAN, C. et al. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces sp.*(ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. **Bioresource technology**, v. 112, p. 83-90, 2012.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.

BANKAR, A. V., KUMAR, A. R., ZINJARDE, S.S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology**. 84, p. 847-865. July. 2009.

BAO, M-T., et al. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v.64, n. 6, p. 1177–1185, 2012.

BARTH, G., GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 219–237, 1997.

BBC – British Broadcasting. **Gulf of Mexico oil leak 'worst US environment disaster**, 2010. Disponível em < <http://www.bbc.co.uk/news/10194335>>. Acesso 05/04/2015

BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Miner. Metall. Proc.**, 17:105-111, 2000.

BEOLCHINI, F., ROCCHETTI, L., REGOLI, F., DELL'ANNO, A. Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: experimental analysis and kinetic Modeling. **Journal of Hazardous Materials**, v.182, n. 1, p. 403–407, 2010.

BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource technology**, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, 2005.

BLUMER, M.; EHRHARDT, M.; JONES, J. H. The environmental fate of stranded crude oil. In: **Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts**, v. 20, n. 3, p. 239-259, 1973.

BOURDICHON, F., et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v.154, n. 3, p. 87-97, 2012.

BRAKSTAD, O. G., et al. Depletion and biodegradation of hydrocarbons in dispersions and emulsions of the Macondo 252 oil generated in an oil-on-seawater mesocosm flume basin. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, n. 1, p. 125-134, 2014.

BRASIL. **Lei Nº 9.478, de 6 de Agosto de 1997**. Brasília, DF, 1997.

BRASIL. **Portaria Nº 032, de 04 de Agosto de 1997**. Brasília, DF, 1997.

BRASIL. **Resolução ANP, nº 50, de 23 de dezembro de 2013**. Brasília, DF, 2013.

BROWN, E.J., BRADDOCK, J.F. Sheen Screen, a miniaturized most-probable-number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. Fairbanks, Alaska. 56 (12), p. 3895-3896. December. 1990.

CAMPOS, J. M., et al., Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097-1108, 2013.

CAO, B. et al. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Singapore. 85, p. 207-228, 2009.

CERQUEIRA, V.S., et al. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource technology**, v. 102, n. 23, p. 11003-11010, 2011.

CHAILAN, F., FLECHE, A LEE. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 587-595, 2004.

CHAMPION, J. T., et al. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.

CHATRE, S., et al. How implementation of quality by design and advances in biochemical engineering are enabling efficient bioprocess development and manufacture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 9, p. 1125–1129. 2011.

CHEN, J., et al. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. **J. Applied Microbiology**. v 112, n. 4, p. 660–671, 2012.

CHEN, M., et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, Available online, In Press, DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.05.003, 2015.

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.

_____ Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846-850, 1985.

CINTRA, R. **Petróleo vaza de plataforma da Modec e já atinge a costa de Angra dos Reis**. 2011. Disponível em: <<http://portalmaritimo.com/2011/12/19/petroleo-vaza-de-plataforma-da-modec-e-ja-atinge-a-costa-de-angra-dos-reis/>>. Acesso em: 19 dez. 2011

COHEN, Y. Bioremediation of oil by marine microbial mats. **International Microbiology**. 5, p. 189–193, 2002.

COOPER, D.G. GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus Species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n.2, p. 224-229, 1987.

CLARKE, K.G. Bioprocess *Scale up*. **Bioprocess Engineering**. An Introductory Engineering and Life Science Approach. 1 ed. Woodhead Publishing. p 171-188, . October. 266 p. 2013.

CRAIG et al. Técnicas de limpeza de vazamentos de petróleo em alto mar. **C. de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 1, n. 1, 75-86, 2012.

CSETE, M. E., DOYLE, John C., Reverse engineering of biological complexity. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1664–1669, March 2002.

CSUTAK, Ortansa et al. Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 545-553, 2015.

DABHOLE, Madhusudan P. Biosimilars: *Scale up* from R&D to Commercial Stage. **PharmaTutor**. v 3, n. 1, p. 10-13, jan 2015.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1339–1345, 2007.

DAVE, D., GHALY, A.E. Remediation Technologies for Marine Oil Spills: A Critical Review and Comparative Analysis. **American Journal of Environmental Sciences** , v 7, n.. 5, p. 423-440, 2011.

DAY, A. **Red light to starboard: Recalling the Exxon Valdez disaster**. Pullman: Whashington State Press, 266 p., 2014

DE BARROS GOMES, E., et al. Microbial community dynamics in diesel waste biodegradation using sequencing batch bioreactor operation mode (SBR). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 21, p. 4899-4908, 2014.

DÍAZ-RAMÍREZ, I.J., et al. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 1, p. 21–30, 2008.

DIAZ, E. **Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology**, 1^a ed., Caister Academic Press, New York, 2008.

DN GLOBO: **Derrame da Chevron pode ser 23 vezes superior**. Brasil, 18 nov. 2011. Disponível em: http://www.dn.pt/inicio/globo/interior.aspx?content_id=2132879&seccao. Acesso em: 05 abr. 2015

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. London: Academic Press Limited, 439 p. 1995.

EINSELE, A. Scaling-up bioreactors. **Process Biochemistry**. 13, p. 13-14, 1978.

FARRELL, P P., SUN, J., GAO, M., SUN, H., PATTARA, B., ZEISER, A., D'AMORE, T Development of a scaled-down aerobic fermentation model for scale-up in recombinant protein vaccine manufacturing. **Vaccine**, v. 30, n. 38, p. 5695 – 5698. August. 2012.

FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology: Extreme Microbiology**, v. 5, n. 173, p. 1-15, 2014.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F. et al. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 12-30, 2011.

FINLAYSON, K. et al. Recovery of a subtropical rocky shore is not yet complete, four years after a moderate sized oil spill, **Marine pollution bulletin**, v. 93, n. 1–2, p. 27–36, 2015.

FUENTES, S., MÉNDEZ, V., AGUILA, P., SEEGER, M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781-4794, 2014.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p.153-176. April. 2009.

GERNAEY et al., Monitoring and control of microbioreactors: an expert opinion on development needs. **Biotechnol Journal**, v.7,p. 1308–1314, 2012.

GIEBEL, H. A. et al., Distribution of Roseobacter RCA and SAR11 lineages in the North Sea and characteristics of an abundant RCA isolate. **The ISME journal**, v. 5, n. 1, p. 8-19, 2011.

GOMES, E. B. Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo Terminal Portuário de Suape – PE. 128 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos), Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife PE, 2004.

HAMDI, H. et al. Solidphase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. **Chemosphere**, v. 70, p. 135-143, 2007.

HIRAKAWA, K. et al. Yas3p, an Opi1 family transcription factor, regulates cytochrome P450 expression in response to n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 7126-7137, 2009.

HUANG, L. et al. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. **Marine Pollution Bulletin**, China, v. 76, n. 1-2, p.325-332, 15 nov. 2013

JAGTAP, S., et al. Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. **Fuel**, v. 116, p. 292-298, 2014.

JIANG, Z., et al. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. **Acta Ecologica Sinica**, v. 30, p. 8-15, 2010.

JOHNSEN, A.R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil Environment. **Pollution**, v. 133, p.71–84, 2005.

JONES,L Shrinking of Aral Sea Causes Regional Heath Crisis. Washington Report on Middle East Affairs, p.28-29, 1999.

JUNKER, B.H. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 347–364, 2004.

KACZOREK, E., et al. Effect of GlucoPON 215 on cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* and diesel oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 129–135, 2015.

KAUPPI, S. **Bioremediation of diesel oil contaminated soil and water**. Tese de Doutorado, 49 p., Department of Environmental Sciences University of Helsinki, Lahti, Finland, 2011.

KENNISH, M.J. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. CRC Press, Inc. Boca Raton, 524 p., 1996.

KITANO, H. Systems biology: a brief overview. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1662–1664, March 2002. (a)

_____. Computational systems biology. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 206–210, November, 2002. (b)

KULSHERSHTHA, A., et al. A Review on Bioremediation of Heavy Metals in Contaminated Water. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v.8, n. 7, p. 44-50, 2014.

KUMAR, A., et al. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

KUMARI, M., ABRAHAM, J. Biodegradation of Diesel using yeast *Rhodospiridium torulooides*. **Journal of environmental toxicology**, v. 5, n. 6, p. 369-377, 2011.

LATTERMANN, C., BUCHS, J. Microscale and miniscale fermentation and screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v.35, p. 1-6, 2015.

LEBKOWSKA, M. et al. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 11, p.1895 – 1900, 2011.

LEDESMA-AMARO, Rodrigo; NICAUD, Jean-Marc. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. **Progress in lipid research**, v. 61, p. 40-50, 2016.

LI, J. et al. Scale-up bioprocess development for production of the antibiotic valinomycin in *Escherichia coli* based on consistent fed-batch cultivations. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 83, 2015.

LIU, H., JI, X., HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. **Biotechnology Advances**, 2015. In Press: [doi: 10.1016 / j.biotechadv.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010)

LIU, S., et al. Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by electron beam irradiation. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n.9,.p. 1-6, 2014.

MAGS, A. **Vazamento de óleo em Tramandaí pode ser o maior no Estado nos últimos 10 anos.** 2012. Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticia/2012/01/vazamento-de-oleo-em-tramandai-pode-ser-o-maior-no-estado-nos-ultimos-10-anos-3645106.html>>. Acesso em: 27 jan. 2012.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2280–2292, 2003.

MANENTI, F. Considerations on nonlinear model predictive control techniques. **Computers and Chemical Engineer**, v. 35, n. 11, p. 2491–2509, 2011

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p.23–26, 2007.

MARIANO, A. P., et al. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 133-142, 2008.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo.** Rio de Janeiro: Interciência, 228 p., 2005.

MÁRQUEZ-ROCHA, F.J.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, V.; LAMELA, M.T. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 128, n. 3-4, p. 313 - 320. June. 2001.

MANEERAT, S. Biosurfactants from marine microorganisms. **Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 6, p. 1263-1272, 2005.

MARQUES, P.C.M., CABRAL, J.M.S., FERNANDES, P. Bioprocess scale-up quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 9, p. 1184 – 1198, 2010.

MARTINS, F. F., et al. Evaluation of Crude Oil Degradation by *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Engineering Transactions**. 27, p. 223 - 228. 2012.

MATSUURA, Y. The role of the ocean in seeding three hundred millions tons weight of human beings. In *Global Change Open Science Conference*, Amsterdam IGBP Secretary, v.1, 2001.

MHATRE, B.A., KUNDE, R. Biodegradation of diesel using microbes from a clam (*Meretrix meretrix*) shell. **Indian Journal Geo-Marine Science**, v. 43, n.5 p. 877–881, 2014.

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

MILTON K. et al. Salinidade em petróleo bruto: otimização de metodologia e proposta de um novo método para extração de sais em petróleo. **Química Nova**, Vol. 33, No. 3, 607-612, 2010.

MOJAHERI, L. et al. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. **Bioresource Technology**. v 101, n. 3, p. 893–900, 2010.

MONTAGNOLLI, R.N. **Biodegradação de derivados do petróleo com aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 245 f. Dissertação (mestrado em ciências biológicas). Curso de pós-graduação em ciências biológicas, Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências de Rio Claro, São Paulo, Março. 2011.

MOSCOSO, F., et al. Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 270 – 276, 2012.

MOSCOSO, F., et al. Insights into polyaromatic hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930: operation at bioreactor scale and metabolic pathways. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 4, pp 1243-1252, 2015.

MUELLER, J.G., et al. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Bioremediation: Principles and Applications*. p. 125–194, **Cambridge University. Press**, Cambridge. 1996.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1 Ed., Elsevier, 421 p, 2007.

NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. **Current Opinion In Biotechnology**, Berlin, Germany, v. 21, n. 1, p.114-121, fev. 2010.

NEUBAUER, P., et al. Consistent development of bioprocesses from microliter cultures to the industrial scale. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 3, p. 224-238, 2013.

NIAZY, Z., et al. Isolation and characterization of diesel-degrading *Pseudomonas* strains from diesel-contaminated soils in Iran (Fars province). **Pollution**, v. 2, n. 1, p. 67-75, 2016.

NIKAKHTARI, H., et al. *Scale up* of diesel oil biodegradation in a baffled roller bioreactor. **Chemosphere**, v.79, n.10, p. 1010 -1016, 2010.

OKOMKOWSKI, J. et al. Development of a robust, versatile and scalable inoculums trais for the production of a DNA vaccine. **Biotechnonology Progress**, v.21, n.4, p. 1038-1047, 2005.

OLIVEIRA, R., et al. A. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. **Bioline**, p. 11-22, 2001.

ONUR, G. Screening of biosurfactant and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters. Doctoral Thesis. Middle East Technical University, 101 p., 2015.

OTERO, J. M., NIELSEN, J., Industrial systems biology. **Biotechnology Bioengineer.**, v. 105, n.1, 439–460, 2010.

PAIXÃO, J.F., et al. Estimating the gasoline components and formulations. toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. **Enviromental Research**, v. 103, n. 3, p. 365-374, 2007.

PASUMARTHI, R., CHANDRASEKARAN, S., MUTNURI, S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. **Marine Pollution Bulletin**, v.76, n. 1-2, p. 276 – 282, 2013.

PENET, S.;et al. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 40 – 47, 2004.

PEREIRA, L.; LEMOS, J. **Ampliação de escala da biodegradação de petróleo por *Aspergillus versicolor***. Disponível em: <[http://cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XII_jic_2004/19Artigo Leonardo Tupi e Judith liliana.pdf](http://cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XII_jic_2004/19Artigo_Leonardo_Tupi_e_Judith_liliana.pdf)>. 2004. Acesso em: 28 abr. 2014

PEREIRA, N. Jr., GOMES, E. de B., SORIANO, A. U. **Biodegradação de Hidrocarbonetos**. Escola de Química – UFRJ. 77 p., 1 ed., v. 3, 2009.

PETROBRÁS. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ: ÓLEO DIESEL METROPOLITANO**. Nº FISPQ: BR0109. 9 p. 2014.

PETROBRÁS. **Refinaria Abreu e Lima**: Informações gerais. 2015. Disponível em <<http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/principais-operacoes/refinarias/refinaria-abreu-e-lima.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

PREISIG, H. A., Constructing and maintaining proper process models. **Computers & Chemical Engineering**, v. 34, n. 9, p. 1543–1555, 2010.

PRIYA, Anchal et al. Mass culture strategy for bacterial yeast co-culture for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. **Marine pollution bulletin**, v. 100, n. 1, p. 191-199, 2015.

QU, L., REN, L., HUANG, H. Scale-up of docosahexaenoic acid production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium sp.* based on volumetric oxygen-transfer coefficient. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 82-87, 2013.

ROBADOR, A.; BRÜCHERT, V.; JORGENSEN, B. B.. The impact of temperature change on the activity and community composition of sulfate-reducing bacteria in arctic versus temperate marine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1692-1703, 2009.

ROBERG, K. J., et al. Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. **Genetics**, v. 147, n. 4, p. 1569 – 1584, 1997.

ROKEM, J. S., LANTZ, A. E., NIELSEN, J., Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 24, 1262–1287. 2007

RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1-5, 2011.

RUFINO, R.D., et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.

SÁENZ-MARTA, C. I. et al. Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation. In: *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*. InTech, 2015, p. 93-109.

SARUBBO, L. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Avaliação do crescimento de *Candida lipolytica* em água do mar suplementada com fontes de carbono e nitrogênio. **Departamento de Química**. Universidade Católica de Pernambuco. Ano 1, n. 1. Jul/dez, 2002.

SCHARF JUNIOR, L. C. et al. **Produção de cerveja**. [s.i.], 2015. 67 slides, color, 25X30. Disponível em: <www.agracadaquimica.com.br/quimica/arealegal/slides/360.pps>. Acesso em: 12 fev. 2016.

SEGER, F.; PAIVA, A.B; CORREIA, M.A.B; HENRIQUES, M.L.O.M.F; CAMPOSTAKAKI, G.M., ALBUQUERQUE, C.D.C. **Diesel oil biodegradation and biosurfactant production in seawater by halo-acidtolerant yeast *Candida lipolytica* UCP 0988**. In: V International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Madrid, Spain. 2 - 4 October 2013.

SIHAG, S.; PATHAK, H.; JAROLI, D. P. Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 2, p. 185-202, 2014.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnology**. v. 22, n. 3 , p. 142 – 146, 2004.

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

SILVA, D.S.P., et al. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.97, p. 85–89, 2015.

SILVA, I. et al. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4669-4675, 2009.

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

SIMONS, K. L., et al. Carrier mounted bacterial consortium facilitates oil remediation in the marine environment. **Bioresource Technology**. 134, p. 107 – 116, 2013.

SOOD, N., LAL, B. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions. **Journal of environmental management**, v. 90, n. 5, p. 1728-1736, 2009.

SOUZA, F.A.S.D; SALGUEIRO, A.A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2012.

STALEY, J. T. Cycloclasticus: A genus of marine polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In: **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 1781-1786, 2010.

STREVA, E. R., PASA, V. M. D., SODRÉ, J. R. Aging effects on gasoline–ethanol blend properties and composition. **Fuel**, v. 90, n. 1, p. 215-219, 2011.

STRONG, P. J., BURGESS, J. E. Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. **Bioremediation Journal**, v. 12, n. 2, p. 70 - 87, 2008.

TABRIZI, H. O., et al. Novel dynamic model for aerated shaking bioreactors. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 128–137, 2011.

TAKORS R. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions, **Journal of Biotechnology**, v.160, n. 1–2, p. 3–9, 2012.

THEVENIEAU, F. et al. Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 6, p. 531-542, 2007.

THEVENIEAU, F. et al. Uptake and assimilation of hydrophobic substrates by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. In: **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1513-1527.

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

TORRES, M. A., et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, n.1, p. 1-15, 2008.

TUFVESSON, P., et al. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. **Food And Bioproducts Processing**, Lyngby, Denmark, v. 88, n. 1, p.3-11, 2010.

URURAHY, A.F.P. Biorremediação de resíduo oleoso proveniente de refinaria. Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 1998.

VANCE-HARROP, M.H., SARUBBO L.A., CARNEIRO DA CUNHA, MG, BUARQUE-GUSMÃO N, CAMPOS-TAKAKI G.M. (1999) Produção de biossurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho por *Candida lipolytica*. **Revista Symposium** , v.2, p.23-27, 1999.

VANCE-HARROP, M.H. **Influência de fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes**. Recife, 2000. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2000.

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

WANG, G., et al. Integration of microbial kinetics and fluid dynamics toward model-driven scale-up of industrial bioprocesses. **Engineering in Life Sciences**. v. 15, n. 1, p.20-29, 2015.

WICKLIFFE, J., et al. A. Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Analytical Methods, Toxicology, and Risk Assessment Research: Seafood Safety after a Petroleum Spill as an Example., **Environmental Health Perspectives** , v. 122, n. 1, p. 6-9, 2014

WOLICKA, D., et al. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 3221–3227, 2009.

XIA, J. et al. Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. **Adv Biochem Eng, Biotechnol**, p. 1-15, 2015.

XU, N., et al. Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 22-30, 2013.

XUE, J., et al. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. **Current microbiology**, p. 1-9, 2015.

TYO, Keith EJ; KOCHARIN, Kanokarn; NIELSEN, Jens. Toward design-based engineering of industrial microbes. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 3, p. 255-262, 2010.

ZHANG, Z.Z., et al. Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. **Bioresource Technology**, v. 102, n.5, p. 4111–4116, 2011.

ZHOU, Q.H., KOSARIC, N. Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactante with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil and Chemists Society**, v. 72, n. 1, p. 67 – 71, 1995.

ZINJARDE, S.S., PANT, A.; DESHPANDE, M. V. Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted seawater, **Mycological Research**, v. 102, n. 5, p. 553 – 558, 1998.

ZINJARDE, S., et al. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. **Biotchnology Advances**, v.32, n.5, p. 920 – 933, 2014.

ZHENG, C., WANG, M., HUANG, Z. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. **Bioresource technology**, v. 110, p. 338-342, 2012.

ZOUBOULIS, A.I., MOUSSAS, P.A. Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation. **Encyclopedia of Environmental Health**, London, p. 1037–1044, 2011

CAPÍTULO II

ARTIGO I: Efeito da salinidade sobre a biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988

H.F. Nobrega, F. Seger; A. M.A.B. Correia; M.L.O.M.F. Henriques; G.M. Campos-Takaki e C.D.C Albuquerque*

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050–590, Recife, PE, Brasil. *autor para correspondência: e-mail: cdaisy@unicap.br, Fone: +55 81 21194012

Artigo publicado no livro “*Microbes in the spotlight: Recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*”, BrownWalker Press, 2016, v.1, p. 75-79.

Efeito da salinidade sobre a biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988

H.F. Nobrega, F. Seger; A. M.A.B. Correia; M.L.O.M.F. Henriques; G.M. Campos-Takaki e C.D.C Albuquerque*

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050-590, Recife, PE, Brasil. *autor para correspondência: e-mail: cdaisy@unicap.br, Fone: +55 81 21194012

Resumo

Neste trabalho, o efeito da salinidade sobre a produção de biomassa, pH e tensão superficial em processo de biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 foi investigado. Dois experimentos testes, em escala de frasco, foram realizados, em triplicata, usando como diluentes; água do mar e água destilada, contaminadas com óleo diesel e suplementadas com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Experimentos controles – abiótico estéril, negativo e positivo – foram realizados para cada experimento teste. Perfis cinéticos de produção de biomassa, pH, salinidade e tensão superficial foram construídos e analisados. Comparações entre os resultados dos experimentos de biodegradação - testes e controles - usando água do mar e água destilada foram realizadas. Os perfis cinéticos de produção de biomassa indicam que *C. lipolytica* apresentou comportamento diáuxico e diferenças significativas nas taxas de degradação de óleo diesel, em água do mar e em água destilada. O efeito da salinidade reduziu mas não inibiu a biodegradação de diesel, que foi favorecida pelo aumento do tempo.

Palavras-chaves: degradação microbiana, hidrocarbonetos, tensão superficial, água do mar, água destilada

1. Introdução

Na segunda década do século 21, o mundo permanece ainda dependente da energia oriunda de combustíveis fósseis e a poluição de mares e oceanos devido ao derramamento de petróleo bruto e de produtos derivados de seu refino (como gasolina, querosene e diesel) continua sendo um dos maiores problemas ambientais. Quando o petróleo entra em contato com a água do mar, ele é submetido a vários processos físico-químicos e biológicos. Entre eles, a biodegradação desempenha um papel importante. Esforços consideráveis têm sido realizados visando compreender o efeito da temperatura e das concentrações de oxigênio e nutrientes (N e P) sobre as taxas e os mecanismos de biodegradação. No entanto, há pouca informação disponível sobre o papel da salinidade sobre a biodegradação de petróleo [1-3]. A água do mar natural tem uma composição química muito variável [4], contendo mais que 50 elementos e um grande número de compostos orgânicos. Meios de cultura marinhos podem ser classificados em dois grupos: os que usam água do mar natural e os que usam água do mar artificial. Tanto a água do mar natural quanto a água do mar artificial são meios não otimizados e compartilham problemas semelhantes com relação às exigências das culturas microbianas; por exemplo macronutrientes, como nitrogênio e fósforo ou metais traço podem ser limitantes [5]. Existem poucos estudos na literatura sobre os efeitos da salinidade sobre a biodegradação de óleo diesel por leveduras em água do mar. No presente estudo, água do mar natural e água destilada contaminadas com óleo diesel, foram suplementadas com nitrogênio (sulfato de amônio) e fósforo (fosfato monobásico de potássio), a fim de estimular o crescimento celular e, em seguida avaliar os efeitos da salinidade sobre o pH, a tensão superficial e a produção de biomassa em processos de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988.

2. Material e métodos

2.1. Micro-organismo

C. lipolytica UCP 0988 foi obtida da coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, da Universidade Católica de Pernambuco, Recife, estado de Pernambuco, Brasil, registrada na *World Federation Culture Collection* (WFCC). A levedura foi mantida a 4°C em meio Yeast Mold Agar (YMA) com a seguinte composição: extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte 3 g/L, glicose 10 g/L, triptona 5 g/L, agar 15 g/L e pH 5.

2.2. Óleo diesel

Comercializado pela Petrobras, tipo metropolitano B7 (mistura diesel / biodiesel 7%), máximo de 0,05% de enxofre; com aditivos; contendo hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos (de 10 a 40%).

2.3. Água do mar

A água do mar foi coletada no Porto de Suape, Pernambuco, Brasil. Sua composição foi Ca⁺⁺ 1.00%; Mg⁺⁺ 0,97%; Na⁺ 11,13%, K⁺ 0.88%, Cl-20.50%, SO₄—3,41%. A salinidade, a gravidade específica, o pH e a tensão superficial foram iguais a 37‰, 1026 kg/m³, 8,22 e 53,43 mN/m, respectivamente.

2.4. Experimentos testes e controles de biodegradação de óleo diesel

Dois ensaios testes com meios para biodegradação de óleo diesel metropolitano B7 por *C. lipolytica* UCP 0988, a base de água do mar (TA-SW *Test Assay-SeaWater*) ou de água destilada (TA-DW *Test Assay-Distilled Water*), foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL com volume útil de 250 mL, usando agitador rotatório a 200 rpm e 28°C, durante 96 h. Os componentes do meio, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, foram dissolvidos em água do mar ou água destilada, ambas esterilizadas. As concentrações iniciais de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio foram iguais a 2 e 13 g / L, respectivamente. O pH inicial, a biomassa inicial (inóculo) e a concentração inicial de óleo diesel foram respectivamente iguais a 5,0; 0,424 g/L e 10% (v/v). Para o ensaio teste com 96h (TA-SW-96h), quatro ensaios controles foram realizados: controle positivo constituído por água do mar, óleo de milho, nutrientes e inóculo (PC-SW *Positive Control-SeaWater*); controle negativo constituído por água do mar, óleo diesel e inóculo (NC-SW *Negative Control-SeaWater*) e controle querosene constituído por água do mar, querosene, nutrientes e inóculo (KC-SW *Kerosene Control-SeaWater*) e o controle abiótico constituído por água do mar, óleo diesel e nutrientes (AC-SW *Abiotic Control-SeaWater*). O controle positivo serviu como ponto de referência para reproduzir a biodegradação sob condições ótimas (não tóxicas). O controle negativo serviu como um ponto de referência para reproduzir a biodegradação em condições sub-ótimas (limitação de nutrientes). O controle com querosene serviu como ponto de referência para reproduzir a biodegradação em condições tóxicas. O controle abiótico serviu para medir as perdas abióticas (ou seja, perdas por volatilização adicional e dissolução). Controles positivo (PC-DW *Positive Control-Distilled Water*), negativo (NC-DW *Negative Control-Distilled Water*), com querosene (KC-DW *Kerosene Control-Distilled Water*) e abiótico (AC-DW *Abiotic Control-Distilled Water*) utilizando água destilada no lugar da água do mar também foram analisados com 96 h para verificar os efeitos da salinidade sobre a biodegradação de óleo diesel. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5. Cinéticas de variáveis ambientais em biodegradação de óleo diesel em água do mar e em água destilada

As cinéticas da salinidade, do pH, da tensão superficial e da produção de biomassa no processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988, utilizando como diluente água do mar e

água destilada foram monitoradas durante 4 dias. Alíquotas de cada experimento foram coletadas em triplicata com 0, 4, 8, 24, 48, 72 e 96h e submetidas a determinações analíticas.

2.6. Análises

As medidas de concentração da biomassa foram realizadas gravimetricamente. O óleo residual foi extraído usando clorofórmio (CHCl_3) e metanol (CH_3OH) a razão de 10:1 [6]. Os pH das alíquotas de água do mar e dos líquidos metabólicos livre de células foram determinados usando um potenciômetro Orion (modelo 310) (Orion Research Inc., Cambridge, MA, USA). As salinidades e a gravidades específicas da água do mar e das culturas livres de células foram determinadas através de refratômetro de mão sem compensação automática de temperatura, com escalas de 0 a 100‰ para salinidade e de 1000 a 1070 para gravidade específica, resolução 0.7%. As tensões superficiais (TS) dos líquidos metabólicos livres de células - obtidos por centrifugação (10.000 x g por 15 minutos) seguida por filtração das culturas - foram determinadas pelo método do anel Du Nouy [6], em temperatura ambiente (28°C), utilizando um tensiometro modelo Sigma 70 (KSV Instruments Ltd. Finland).

3. Resultados e discussão

3.1. Cinética de crescimento de *C. lipolytica* UCP 0988 em biodegradação de óleo diesel em água do mar e água destilada

Os perfis cinéticos de produção de biomassa no TA-SW e no TA-DW estão apresentados na Figura 1. A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 apresenta ciclos de crescimento não convencionais no TA-SW e no TA-DW. Nas condições estudadas, a regulação fisiológica desta levedura conduz ao crescimento diáuxico. Os resultados sugerem que o biodiesel é um substrato com prioridade de utilização por *C. lipolytica* UCP 0988 em relação ao óleo diesel. O óleo diesel metropolitano B7 foi metabolizado de modo sequencial. A presença de 7% de biodiesel no óleo diesel metropolitano pode ter levado a repressão de enzimas para o metabolismo do óleo diesel. Portanto, apenas quando a concentração de biodiesel é reduzida através do consumo por esta levedura, pode ocorrer a produção de enzimas para o metabolismo do óleo diesel. Trabalhos anteriores relacionados com a biodegradação de misturas de biodiesel e diesel, e focados principalmente na contaminação da água, têm demonstrado que o biodiesel e as misturas de biodiesel/diesel são mais facilmente e mais rapidamente biodegradadas que o óleo diesel [7]. Outras explicações possíveis para o comportamento diáuxico do crescimento são: (i) a acumulação transitória de um metabolito, o qual eventualmente irá servir como uma fonte nutricional secundária, (ii) a mudança na composição das próprias células e (iii) emergência e a coexistência em meios de biodegradação de dois tipos de células estáveis com estratégias metabólicas alternativas [8-9].

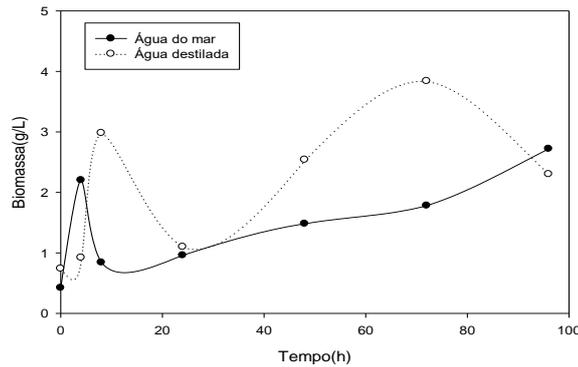


Fig. 1 Produção de biomassa em meios para biodegradação de diesel usando como diluente água do mar e água destilada

3.2. Ensaios testes e controles

Os ensaios controles foram avaliados após 96 h de cultivo. As produções mais elevadas de biomassa foram obtidas nos controles positivos (PC-SW, PC-DW) e nos ensaios testes com água do mar e água destilada (TA-SW, TA-DW), respectivamente (Figura 2). A mudança de substrato de óleo diesel (tóxico) para óleo de milho (não tóxico) no controle positivo obviamente favoreceu o aumento da produção de biomassa em comparação ao ensaio teste. Nestes mesmos ensaios (teste e controle), as concentrações de biomassa em água do mar foram maiores do que as concentrações de biomassa em água destilada, ressaltando a importância dos sais minerais dissolvidos na água do mar para a biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988, além da suplementação com nitrogênio e fósforo. A comparação dos ensaios testes e controles negativos permite observar que a adição de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio no TA-SW e no TA-DW favoreceu a produção de biomassa em ambos os ensaios. Por outro lado, a mudança de substrato de óleo diesel para querosene desfavoreceu a produção de biomassa nos ensaios controles com querosene (KC-SW and KC-DW), uma vez que o querosene é potencialmente mais tóxico que o diesel. Em todos os experimentos, as tensões superficiais em meios a base de água do mar foram maiores do que as tensões superficiais dos meios a base de água destilada, revelando uma relação inversa entre o aumento da salinidade e a redução da tensão superficial.

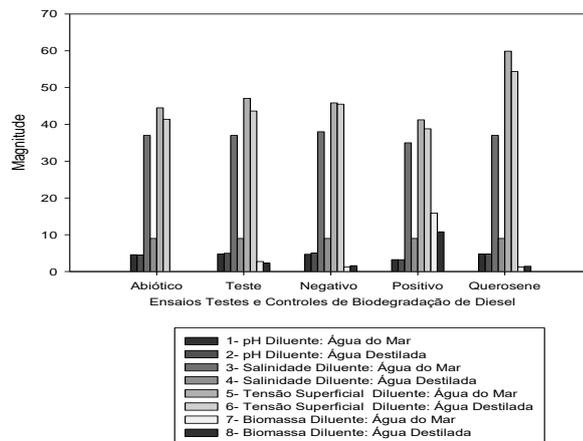


Fig. 2 Ensaios testes e controles de biodegradação diesel usando como diluente água do mar e água destilada

3.3. Modelagem

Um modelo com três-fases (linear ascendente, linear descendente e exponencial) e um modelo com quatro-fases (exponencial, linear descendente, exponencial e linear descendente) foram desenvolvidos para simular os perfis cinéticos de crescimento da biomassa nos TA-SW e TA-DW. A tabela 1 mostra os modelos e parâmetros cinéticos obtidos a partir da modelagem matemática. Ambos os modelos de crescimento para biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 são baseados na cinética de Monod (1949). As taxas de crescimento específicas (k) foram determinadas durante as fases exponenciais e os tempos de duplicação (t_d) foram calculados através da incorporação das taxas de crescimento específicos. No TA-SW, a taxa de crescimento específico foi duas vezes menor do que no TA-DW, revelando o forte efeito inibitório da salinidade sobre a taxa de crescimento dos micro-organismos que degradam óleo diesel. As análises de regressão foram realizadas utilizando os softwares: Statistica Versão 8.0 (Statsoft Inc., USA) e Sigma Plot versão 11 (Systat Soft.Inc., Germany).

Tabela 1. Comparação de modelos cinéticos e parâmetros para o crescimento de *Candida lipolytica* 0988 UCP em processos de biodegradação de óleo diesel utilizando como diluentes a água do mar e água destilada

Fase de Crescimento	Água do Mar				Água destilada			
	Modelo Biomassa	R^2	k (h^{-1})	t_d (h^{-1})	Modelo Biomassa	R^2	k (h^{-1})	t_d (h^{-1})
Linear Ascendente	$m=0,445t+0,42$	1,000	-	-	-	-	-	-
Exponencial	-	-	-	-	$m=0,6308e^{0,1741t}$	0,864	0,174	3,981
Linear Descendente	$m=-0,34t+3,56$	1,000	-	-	$m=-0,1175t+0,92$	1,000	-	-
Exponencial	$m=0,7437e^{0,013t}$	0,985	0,013	51,913	$m=0,6318e^{0,026t}$	0,963	0,026	26,613
Linear Descendent	-	-	-	-	$m=-0,0642t+8,46$	1,000	-	-

R^2 – Determination coefficient k - Specific growth rate t_d - doubling time m -biomass (g/L) t – time (h)

3.4. Efeitos da salinidade

Os perfis cinéticos da salinidade, pH, tensão superficial e produção de biomassa no TA-SW e no TA-DW são apresentados na Fig. 3(a-e). No TA-SW – durante a fase ascendente linear (Fig.1 e Fig.3c) – as leveduras utilizam preferencialmente para crescer, o biodiesel, fonte de carbono não tóxica, e sais nutrientes, havendo, então, aumento na produção de biomassa e redução da salinidade, do pH e da tensão superficial (ST). Na fase linear descendente, a salinidade, o pH e a tensão superficial continuam decrescendo e apenas as células mais adaptadas aos estresses salino, ácido e tóxico (óleo diesel) sobrevivem. Entre 8 e 96 h, ocorre a assimilação do óleo diesel, associada à produção exponencial de biomassa. O pH (Fig.3a) e a TS (Fig.3b) inicialmente diminuem – atingindo valores mínimos em torno de 20 h, e depois aumentam, atingindo valores de pico em torno de 48 e 72 h, respectivamente. A salinidade diminui até aproximadamente 35 h e depois aumenta até atingir um valor de pico em 72 h. Após 72 h, o pH e a salinidade aumentam e a tensão superficial diminui até 96h (Fig.3a-c). A produção máxima de biomassa (2,72 g/L) foi alcançada com 96h, salinidade de 37‰, pH 4,78 e TS igual a 47,07 mN/m. Os perfis cinéticos de salinidade, pH, TS e produção de biomassa, no TA-DW, são suficientemente diferentes do TA-SW, para permitir a avaliação do efeito da ausência dos sais minerais presentes na água do mar, na produção de biomassa no processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988.

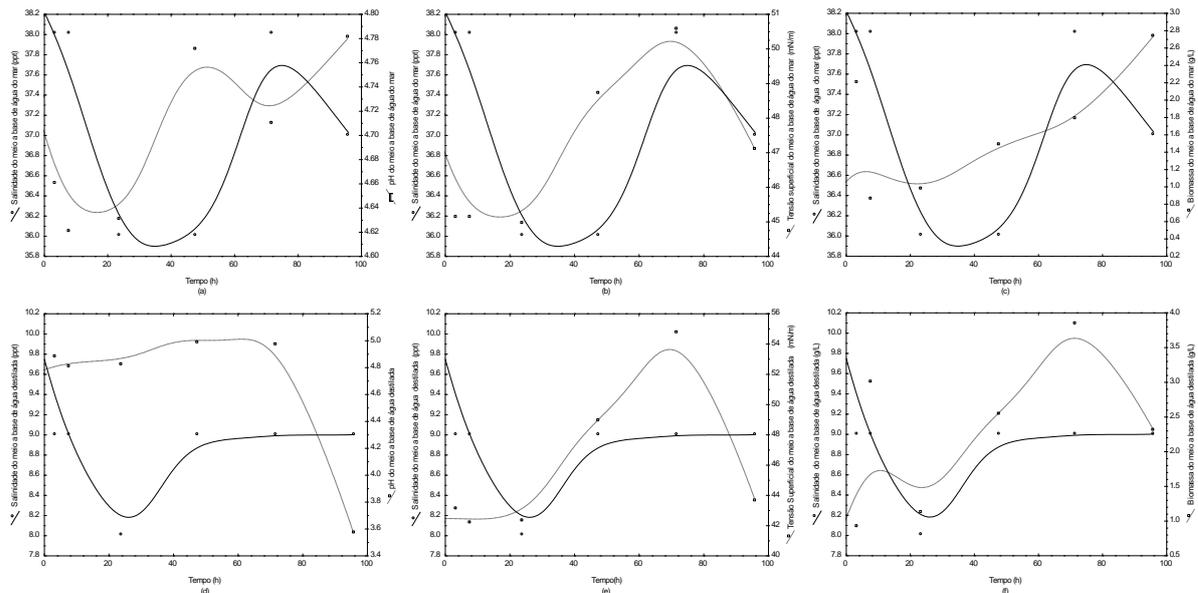


Fig. 3 Efeitos da salinidade sobre: pH (a e d), tensão superficial (b e e) e concentração de biomassa (c e f) em meios a base de água do mar (a, b e c) e água destilada (d, e e f)

No TA-DW, durante a primeira fase exponencial e a primeira fase de declínio linear (Fig.3f), as leveduras usam inicialmente o biodiesel e sais nutrientes para sobreviver, enquanto o pH aumenta lentamente (Fig.3d), a TS permanece praticamente constante (Fig.3e) e a salinidade diminui até alcançar um valor mínimo após cerca de 24h (Fig.3f). Na fase exponencial tardia, o pH aumenta lentamente até 72 h, apresentando uma ligeira variação associada à produção de biomassa (Fig. 3d). A TS também aumenta associada à produção de biomassa até 72h (Fig.3e), quando ambos alcançam valores de pico e depois diminuem continuamente até 96h. A salinidade aumenta associado à produção de biomassa (Fig. 3f) e a tensão superficial (Fig.3e) até 48 h, e então permanece praticamente constante, variando em torno de 9‰ até 96h, favorecendo a produção de biomassa (Fig.3e), inibindo a produção biossurfactante pelo aumento do seu consumo (Fig.3e) e pela produção de ácidos orgânicos (Fig.3d), entre 48 e 72 h. O declínio da produção de biomassa (Fig.3f), entre 72 e 96h, está provavelmente associado com a morte das leveduras, devido a limitação da fonte de carbono e de sais nutrientes, a redução do pH (produção de ácidos) e a redução da TS (produção de biossurfactantes). A produção máxima de biomassa (2,3 g/L) foi alcançada com 96h, salinidade de 9‰, pH 3,56 e TS igual a 43,65 mN/m. No processo descrito acima, a redução da TS está relacionada com a produção de biossurfactante, acessibilidade e a biodegradação, enquanto a elevação da TS está relacionada com a utilização de biossurfactantes produzidos pelas leveduras. Vários estudos corroboram com os resultados acima [10-11]. A salinidade tem um grande impacto na biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988. Os resultados sugerem que alta salinidade (maior que 35‰) constitui uma barreira natural para a biodegradação de óleo diesel, mas que a levedura halotolerante *C. lipolytica* UCP 0988 apresenta capacidade para crescer em óleo diesel e aumentar a sua biodegradação, em ambos os ambientes, TA-SW e TA-DW.

Conclusão

A alta salinidade exerce um forte efeito inibitório sobre o crescimento das células e sobre a biodegradação de hidrocarbonetos do óleo diesel. O tempo de duplicação em TA-SW é aproximadamente duas vezes mais lento que em TA-DW. No entanto, a extensão da fase exponencial e do processo de biodegradação de óleo diesel em TA-SW é maior que em TA-DW.

Sendo uma levedura marinha facultativa, *C. lipolytica* UCP 0988 adapta seus sistemas biológicos e fornece respostas de defesa efetivas ao estresse salino. As alterações fisiológicas e os produtos (biossurfactantes/bioemulsificantes, entre outros) sintetizados para manter o crescimento celular e sobrevivência em ambiente aquático hipersalino (salinidade superior a 35‰) contaminado com óleo diesel, favorecem o crescimento celular e a absorção e biodegradação de hidrocarbonetos de diesel por *C. lipolytica* UCP 0988, nas condições investigadas.

Agradecimentos: Este trabalho foi apoiado financeiramente pela *FACEPE, CNPq, CAPES e UNICAP.*

Referências

- [1] Mille G, Ahmal'lah M, Bianchi M, Van Wanbeke F, Bertrand JC. Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1991, 339:788-791.
- [2] Bertrand J-C, Bianchi M, Mallah MA, Acquaviva M, Mille G. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1993;168: 125-138.
- [3] Thavasi R; Jayalakshmi S; Balasubramanian T; Banat I. Effect of salinity, temperature, pH and crude oil concentration on biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. 2007;1:51-57.
- [4] Gagneaux-Moureaux S, Moreaux C, González J, Cosson P. Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia* and other marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 2007; 19:549-556.
- [5] Zhou QH, Kosaric N. Utilization of canola and lactose to produce extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters*. 1995; 15: 477-482.
- [6] Singh P, Cameotra S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22: 142-146.
- [7] Mariano AP, Tomassela RC, Oliveira LM, Contiero J, de Angelis DF. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7:1323-1328.
- [8] Monod, J. The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology*. 1949; 3:371-394.
- [9] Solopova, A, van Gestel J, Weissing F, Bachmann H, Teusink B, Kok J. Bet-holding during bacterial diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111:7427-7432.
- [10] Desai JD, Banat I M (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997; 61: 47-64.
- [11] Moliterni E, Gómez R, Rodríguez L, Fernández, FJ Villaseñor J. Biosurfactants production during diesel biodegradation by mixed microbial consortia selected from polluted spools. *International Journal of Environmental Research*, 2012; 6:751-760

CAPÍTULO III

ARTIGO II: Ampliação de escala de processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar mediada por biofilme de *Candida lipolytica* UCP 0988

Hamilton F. Nobrega,^a Fabiane Seger,^a Maria A. B. Correia,^a Maria L. O. M. F. Henriques,^a Galba M. C. Takaki,^a and Clarissa D. C. ALbuquerque*

^a Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Rua Nunes Machado, 42 , Bloco J , Térreo , Boa Vista , CEP 50,050-590 , Recife , PE , Brasil

Manuscrito submetido a revista Marine Pollution Bulletin

Ampliação de escala de processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar mediada por biofilme de *Candida lipolytica* UCP 0988

Hamilton F. Nobrega,^a Fabiane Seger,^a Maria A. B. Correia,^a Maria L. O. M. F. Henriques,^a Galba M. C. Takaki,^a and Clarissa D. C. ALbuquerque*

^a Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Rua Nunes Machado, 42 , Bloco J , Térreo , Boa Vista , CEP 50,050-590 , Recife , PE , Brasil

*Autor para correspondência: Tel.:+55 (81) 21194015 Fax: +55 (81) 21194020. E-mail: cdaisy@unicap.br

Resumo

Experimentos de *scale up* foram realizados em frascos de Fernbach de 2.8-L e em biorreator de bancada de 5 L para estudar a biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar suplementada por sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. A levedura mostrou potencial para utilizar óleo diesel como única fonte de carbono e energia, sendo capaz de utilizar n-alcanos, alcanos ramificados e compostos aromáticos, com preferência por alcanos com comprimentos intermediários de cadeia de carbono. A porcentagem de biodegradação de óleo diesel foi determinada usando método gravimétrico e cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa do óleo diesel residual após 9 dias. Formação de biofilme contribuiu para aumentar a eficiência da degradação dos hidrocarbonetos. Aeração e agitação influenciaram o crescimento e a biodegradação de hidrocarbonetos. A estratégia de *scale up* em dois estágios adotada no presente trabalho foi efetiva e pode facilitar ampliações adicionais do processo para escalas semi-piloto, piloto e industrial.

Palavras-chave: *Yarrowia lipolytica*, hidrocarbonetos, petróleo, biorremediação, biossurfactante, biofilme.

1. Introdução

O potencial das leveduras para metabolizar hidrocarbonetos encontra-se estabelecido na literatura (Cerniglia e Crow, 1981; Cong et al., 2014; Gargouri et al., 2015). Leveduras marinhas são consideradas agentes de biodegradação verdadeiramente versáteis. Elas participam de uma quantidade de processos ecologicamente significativos no mar, especialmente em estuários e ambientes costeiros (Kutty e Philip, 2008). Recentes pesquisas mostram que leveduras marinhas tem várias características únicas e vantajosas sobre as leveduras terrestres, como maior tolerância a osmose, maior produtividade química e produção industrial de enzimas especiais (Zaky et. al, 2014).

Embora leveduras marinhas ainda não sejam largamente usadas em escala industrial, em processos de biorremediação *ex-situ* de mares e oceanos contaminados com petróleo e seus derivados, pesquisas de estratégias de ampliação de escala, para processos de biodegradação de hidrocarbonetos por leveduras de ecossistemas marinhos, podem conduzir ao desenvolvimento tanto de tecnologias de biorremediação ambientalmente amigáveis, custo-efetivas e inovadoras quanto de bioprodutos com alto valor agregado como biossurfactantes, bioemulsificantes e enzimas (Kutty e Philip 2008; Zaky et. al, 2014).

Biorremediação *in situ* de águas de mares e oceânos contaminadas por petróleo e produtos petrolíferos como o óleo diesel é ainda um grande desafio, devido às dificuldades para avaliar e controlar os fatores críticos envolvidos, especialmente os ambientais. Quando a biorremediação *in situ* pode ser realizada de forma segura, ela é muito menos dispendiosa e causa menos perturbação ambiental que os métodos de limpeza físicos de biorremediação *ex situ*. Quando a biorremediação *in situ* não pode ser realizada, a biorremediação *ex-situ* é uma tecnologia alternativa considerada eficaz e amigável para o ambiente. Em geral, a aplicação de biorremediação *ex-situ* está associada a processos de biodegradação de hidrocarbonetos realizados em batelada ou em batelada alimentada,

iniciados e otimizados em escala de laboratório e depois transferidos para escala piloto e/ou escala industrial (Paniagua-Michel; Rosales, 2015)

O método tradicional de ampliação de escala (*scale up*) de bioprocessos é geralmente baseado em critérios empíricos, como entrada constante de energia por unidade de volume, coeficiente de transferência de massa constante, tempo de mistura constante e velocidade do impulsor constante (Shuler et al., 1992). No entanto, os critérios empíricos supracitados apresentam problemas, especialmente devido a mudanças no regime de controle durante o *scale up* (Charles, 1985).

No presente trabalho foi proposta uma estratégia de *scale up* em dois estágios para a biodegradação de óleo diesel em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 - seguindo os mesmos fundamentos utilizados na abordagem de *scale up* de bioprocessos introduzida por Hsu e Wu (2002), com base na avaliação dos efeitos das variáveis ambientais sobre a biodegradação e da variação das variáveis ambientais.

Durante as últimas décadas, abordagens similares têm sido utilizadas em ampliação de processos de biodegradação de hidrocarbonetos, entre escalas de frascos agitados e/ou biorreator de bancada e/ou piloto e/ou industrial (Gomes et. al, 2010, Silva et. al, 2012; Usharani e Muthukuma, 2013; Sharma et. al, 2014; Moscoso et al 2015).

Neste trabalho, a ampliação de processo de biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar suplementada com nitrogênio e fósforo, foi realizada da escala de frascos de Fernbach de 2,8L para a escala de biorreator de bancada de 5L - visando investigar, entre outros, os efeitos da agitação e da concentração inicial de inóculo.

2. Materiais e métodos

2.1. Micro-organismo e meio de manutenção

A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 foi obtida da coleção de culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), abrigada no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e

Biotecnologia, Recife Pernambuco, Brasil e registrada na Base de Dados do Centro Mundial de Dados para Micro-organismos (World Data Center for Microorganism-WDCM) da Federação Mundial para Coleção de Culturas (*World Federation for Culture Collection*) sob o nº WDCM 927. A levedura foi mantida a 4° C em meio ágar YMA com a seguinte composição: extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte, 3 g/L, glicose a 10 g/L, triptona a 5 g/L, agar 15 g/L e pH 5.

2.2. Óleo diesel

Óleo diesel, tipo metropolitano B7 (mistura 93% diesel - 7% biodiesel), comercializado em posto Petrobrás, máximo de 0,05% de enxofre; com aditivos; contendo hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos (10 a 40%).

2.3. Água do mar

A água do mar foi coletada no Porto de Suape, Pernambuco, Brasil. Composição: Ca⁺⁺ 1,00%; Mg⁺⁺ 0,97%; Na⁺ 11,13%, K + 0,88%, Cl-20,50%, SO₄⁻ 3,41%. A salinidade, gravidade específica, pH e tensão superficial foram iguais a 37 ‰; 1026 kg/m⁻³, 8,22 e 53,43 mN / m, respectivamente.

2.4. Estratégia em dois estágios para ampliação de escala (*scale up*) de processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar

O tipo de biorreator e as condições iniciais adotadas pela estratégia de ampliação de escala em dois estágios encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Condições operacionais (volume, pH, temperatura taxa de agitação e taxa de aeração) e nutricionais (diesel, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4) iniciais utilizadas em estratégia de ampliação de escala, em dois estágios, de processo biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988 em água do mar, suplementada com sais de nitrogênio e fósforo

Biorreator tipo	Condições iniciais operacionais e nutricionais									
	Volume		pH	Temperatura (°C)	Taxa Agitação (rpm)	Taxa Aeração (vvm)	Concentração			
	Total (L)	Útil (L)					Biomassa ¹ (g/L)	Diesel (%v/v)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ² (g/L)	KH_2PO_4 ² (g/L)
Fernbach	2.8	1.5	5	28	200	0.867	0.636	10	13	2
BioFlo 2000 ³	5.0	4.0	5	28	300	0.875 ⁴	0.636	10	13	2

¹ células de leveduras crescidas em meio YMA por 48 h ² Diluente: água do mar ³ News Brunswick Scientific Co., EUA ⁴ 3,5L ar / min

No início de cada etapa do processo da ampliação de escala, os biorreatores (frascos de Fernbach de 2.8L ou biorreator de bancada BioFlo 2000 de 5L) foram parcialmente preenchidos com meio mineral (MM), isto é, com água do mar, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio nas concentrações especificadas na Tabela 1. O pH inicial do MM foi ajustado para 5,0, sendo monitorado durante todo o processo, mas sem ser controlado automaticamente. O MM foi esterilizado em autoclave a 121° C, durante 20 minutos. A única fonte de carbono utilizada foi o óleo diesel metropolitano tipo B7, que foi autoclavado em vapor fluente durante 15 min, em frasco de vidro previamente esterilizado. O óleo diesel foi adicionado ao MM nas concentrações acima especificadas. O processo de biodegradação foi iniciado com a inoculação direta aos biorreatores de células de *C. lipolytica* UCP 0988, crescidas em meio YMA por 48 h e não submetidas a aclimação prévia. Os valores das taxas de agitação e aeração e da concentração inicial de biomassa estão especificados na Tabela 1. Nas duas fases da estratégia de ampliação de escala, os processos de biodegradação de óleo diesel foram realizados durante 216 h (9 dias). Os biorreatores foram operados, em modo batelada, sem controle de pH e de oxigênio dissolvido. Nas duas etapas do *scale up*, controles abióticos (sem inóculo) foram preparados para determinação de perdas de óleo diesel por extração e volatilização. Amostras foram coletadas, de forma estéril, em 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 192 e 216 h, para análises posteriores. O volume das alíquotas coletadas dos frascos Fernbach e do

biorreator de bancada Bioflo 2000 foi 50 mL. Todos os tratamentos e análises foram realizadas em duplicata.

2.5 Planejamento fatorial completo 2^2 em escala de frasco de Fernbach

Um planejamento fatorial completo (PFC) 2^2 , constituído por 4 ensaios, foi realizado em duplicata, em escala frasco de Fernbach, para verificar os efeitos e interações da concentração inicial de biomassa (inóculo) e da taxa de agitação sobre a concentração final de biomassa, a tensão superficial, a atividade de emulsificação e a biodegradação do óleo diesel. Os intervalos e níveis dos fatores (ou variáveis independentes) estão apresentados na Tabela 2 e foram otimizados e validados previamente (Henriques 2013, Seger 2013). As análises estatísticas dos resultados dos experimentos do PFC 2^2 foram realizadas utilizando os softwares Statistica® versão 8.0 (Statsoft, Inc., EUA) e SigmaPlot® versão 8.0 (Systat, Inc., Germany).

Tabela 2 - Valores da concentração inicial de biomassa e da velocidade de agitação em diferentes níveis do planejamento fatorial completo 2^2

Variável Independente	Nível	
	-1	1
Biomassa inicial (g/L)	0,212	0,636
Taxa de agitação (rpm)	150	200

Para o melhor ensaio do PFC 2^2 foram realizados: controle positivo constituído por água do mar, óleo de milho, nutrientes e inóculo: controle negativo constituído por água do mar, óleo diesel e inóculo e o controle abiótico constituído por água do mar, óleo diesel e nutrientes. O controle positivo serviu como um ponto de referência para a biodegradação reprodutível sob condições ótimas (não tóxico). O controle negativo serviu como um ponto de referência para a biodegradação reprodutível em condições sub-ótimas (limitação de

nutrientes). O controle abiótico serviu para medir as perdas abióticas (ou seja, perdas por volatilização adicionais e dissolução).

2.6 Estimativa de biomassa

A biomassa foi determinada gravimetricamente, por medida de peso seco, após permecer em estufa a 80 °C, durante 24 horas. O óleo residual foi extraído da biomassa, utilizando uma mistura de metanol (CH₃OH) e clorofórmio(CHCl₃) na proporção de 10:1 (Zhou e Kosaric, 1995). Cálculos específicos foram realizados para expressar a biomassa em g/L.

2.7 Tensão Superficial

A tensão superficial do líquido metabólico livre de células - obtido por centrifugação das culturas a 10.000xg durante 15 min - foi determinada através de tensiômetro digital Sigma 70 (KSV Instrument Ltd- Finlândia), usando o método do anel *Du Noy* (Singh e Cameotra, 2004). Os valores relatados são a média de três medições.

2.8 Atividade de Emulsificação

A atividade de emulsificação foi determinada de acordo com o método de Cirigliano e Carman (1984), no qual 2 mL de líquido metabólico livre de células foi diluído em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,0), em um tubo de ensaio com tampa de rosca (15 por 125 mm), ao qual se adicionou 1 ml de hexadecano e seguiu-se a agitação em vórtex, durante 2 min, a 28°C. A emulsão resultante foi deixada em repouso durante 10 min. Após esse tempo, a sua absorvância foi lida a 540 nm, sendo o meio de cultivo utilizado como branco. Os mesmos procedimentos foram realizados com óleo diesel e óleo de milho. Uma unidade de atividade de emulsificação (UAE) foi definida como a quantidade de agente emulsionante necessária para produzir uma emulsão com absorvância igual a 540 nm.

2.9 Índice de emulsificação

Foi determinado após 24h (E_{24}), de acordo com Cooper e Goldberg (1987), por adição de 6 mL de um substrato para emulsificação (óleo diesel, óleo de motor, n-hexadecano e óleo de milho) a 4 ml de líquido metabólico livre de células, misturando-se em um vórtex durante 2 min, e deixando-se repousar durante 24 h. O índice E_{24} foi calculado em forma de porcentagem, com o valor da altura da camada de emulsão (mm) dividido pela altura total da coluna (mm).

2.10 Determinação da salinidade e gravidade específica

A salinidade e a gravidade específica da água do mar e das culturas livres de células foram determinadas utilizando refratômetro de mão sem compensação automática de temperatura, com intervalo de salinidade variando de 0 a 100‰ e intervalo de gravidade específica variando de 1000-1070, resolução 0,7%.

2.11 Extração do Óleo Diesel

Amostra de 15 mL de líquido metabólico livre de células foi extraída com 15 mL de n-hexano (solvente). A fase de n-hexano (óleo residual) foi coletada em frascos, e o extrato foi desidratado com 10g de Na_2SO_4 . O extrato foi filtrado em funil de vidro usando papel de filtro Whatman N° 4 e em seguida submetido a uma nova filtração, usando membrana Millipore® de 0,22, para eliminar quaisquer resíduos e assegurar a pureza da amostra para análise por GC-MS. Controle não inoculado foi preparado para contabilizar a volatilização abiótica e as perdas por extração do diesel. A porcentagem de biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) por *C.lipolytica* UCP 0988 foi calculada de acordo com a seguinte equação: $TPH(\%) = \left[\frac{(X_c - X_s)}{X_c} \right] 100$, na qual X_c é o óleo diesel residual na amostra controle, e X_s é o óleo diesel residual na cultura teste.

2.12 Análise da degradação do diesel por cromatografia gasosa e espectrometria de massa

A análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS *Gas Chromatography - Mass Spectroscopy Analysis*) foi realizada para detectar os efeitos da biodegradação do óleo diesel (Zhenle et al 2006, Palanisamy et al 2014, Hou et al 2013). As amostras retiradas do processo de biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988 com 0h e 216 h foram analisadas por GC/MS para determinar a quantidade e a composição total de hidrocarbonetos. O extrato foi analisado em um cromatógrafo a gás Shimadzu™ (17A/modelo QP5050A), equipado com uma coluna capilar VB-5-MS, padrão não-polar (30m x 0,25mm x 0,25µm) e com injetor split/slitless (razão 105:1). A temperatura do forno foi programada inicialmente para 40°C durante 4 minutos e depois programada para 290° C a uma velocidade de 4°C/min, onde foi mantida durante 8 min. A temperatura do injetor, da linha de transferência e da fonte ionização foi 290° C. A ionização por impacto de elétrons foi sintonizada em 70 eV. O hélio foi utilizado como gás de arraste com uma velocidade linear média de 1,0 mL/min. Um microlitro da fase orgânica (óleo extraído da amostra) foi injetado. As injeções de amostras foram efetuadas utilizando três repetições independentes. A análise foi por varredura (m/z 35 a 500). Os hidrocarbonetos foram identificados pelo comportamento no tempo de retenção em comparação com amostras conhecidas e pelo uso da biblioteca NIST para espectros de massa (Gomes, 2010). A percentagem de degradação foi calculada através do cálculo da diferença da área sob a curva dos modelos individuais dos hidrocarbonetos, e seus respectivos controles.

3. Resultados e discussão

Identificar as condições de biodegradação do óleo diesel em biorreatores de pequena escala é o primeiro passo para modelagem, simulação, otimização e operação, em escalas piloto e industriais, de processos de biorremediação *ex situ* de água de mares e oceanos

contaminadas por petróleo e derivados. Existe pouca informação disponível na literatura sobre a biodegradação de óleo diesel em água do mar por leveduras (Charles, 1985; Gomes et al., 2010; Moscoso et al., 2015). Estudos preliminares (Henriques, 2013; Seger, 2013) identificaram as concentrações de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio necessárias para a redução de concentrações elevadas de óleo diesel em água do mar (Tabela 1). Estas condições nutricionais foram usadas no desenvolvimento da estratégia de *scale up* em dois estágios proposta neste trabalho, na qual foram investigados, entre outros, os efeitos da concentração inicial de biomassa e da taxa de agitação, sobre a biodegradação do óleo diesel. A referida estratégia, apresentada a seguir, foi bem sucedida na ampliação de escala de processo de biodegradação de óleo diesel B7 à 10% (v/v), em água do mar por *C. lipolytica* UCP 0988.

3.1 Primeiro estágio - Estudos de biodegradação de óleo diesel em escala de frasco de Fernbach (2,8 L)

Os resultados do planejamento fatorial completo 2², realizado em escala de Fernbach são apresentados na Tabela 3 e mostram que a levedura *C. lipolytica* UCP 0988 tem habilidade de crescer sobre óleo diesel em água do mar, suplementada com sulfato de amônio e fosfato de potássio monobásico.

Tabela 3 - Valores dos fatores (variáveis independentes) e das variáveis respostas (variáveis dependentes) do planejamento fatorial completo 2² realizado em duplicata

N	Fator		Variável Resposta com 216 h								
	Biomassa Inicial (g/L)	Taxa de Agitação (rpm)	Biomassa (g/L)	pH	Salinidade (ppt)	GE ¹	Tensão superficial (mN/m)	AED ² (UEA)	AEM ³ (UEA)	Volume Diesel (v/v%)	BHTP ⁴ (%)
1	0,212	150	4,106	4,08	51	1036	39,84	0,361	0,343	0,119	20,67
2	0,636	150	5,397	4,2	53	1038	39,77	0,144	0,455	0,106	29,33
3	0,212	200	5,499	3,15	52	1037	40,00	0,099	1,582	0,114	24,00
4	0,636	200	6,334	2,96	51	1036	46,49	0,398	1,073	0,110	26,67
5	0,212	150	4,493	4,02	51	1036	38,56	0,371	0,396	0,120	20,00
6	0,636	150	5,102	4,11	53	1038	39,55	0,162	0,461	0,109	27,33
7	0,212	200	5,261	3,10	52	1037	39,96	0,984	1,503	0,113	24,67
8	0,636	200	6,232	2,94	51	1036	46,51	0,423	1,096	0,107	28,67

¹ GE-Gravidade específica ² AED -Atividade de Emulsificação para emulsões com Diesel ³ AEM -Atividade de Emulsificação para emulsões com óleo de Milho ⁴ BHTP - Biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Análise de regressão e análise de variância (ANOVA) foram aplicadas aos resultados apresentados na Tabela 2. Modelos de primeira ordem foram ajustados aos dados para avaliar os efeitos principais e as interações dos dois fatores sobre as cinco variáveis dependentes. Os modelos desenvolvidos para biomassa, pH, tensão superficial e percentagem de biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo não exibiram falta de ajuste significativa aos dados experimentais e explicam 90% da variabilidade das respostas (Tabela 4).

Tabela 4 - Modelos de ordem para a biomassa 216h, pH, tensão superficial e porcentagem de biodegradação com a função de 0h biomassa e taxa de agitação 0h.

Variável Dependente 216h	Modelo de Primeira Ordem	R^2	R^2_{adj}
Biomassa	$z=0,5063+2,5814*x+0,0221*y-0,0023*x*y$	0,96303	0,93531
pH	$z=6,3525+2,2288*x-0,0157*y-0,0132*x*y$	0,99685	0,99449
Tensão Superficial	$z=45,7093-41,7795*x-0,0449*y+0,2858*x*y$	0,98839	0,97968
% de Biodegradação	$z=-3,0721+45,9650*x+0,1299*y-0,1885*x*y$	0,99052	0,98342

z - Variável dependente com 216 h x: 0h Biomass y: A velocidade de agitação

A significância de cada coeficiente dos modelos foi determinada pelo teste *t* e valores *p*, que estão graficamente representados nos diagramas de Pareto ilustrados na Figura 1, e permitem a análise dos efeitos e interações da concentração inicial de biomassa e da taxa agitação sobre a concentração de biomassa (Fig.1a), o pH (Fig.1b), a tensão superficial (Fig.1c) e a porcentagem de biodegradação do total de hidrocarbonetos de petróleo (Fig.1d) com 216 h. O comprimento de cada barra no diagrama de Pareto padronizado é proporcional ao valor absoluto do seu coeficiente associado ou efeito estimado. O gráfico inclui uma linha vertical, que corresponde ao limite de confiança de 95% que indica a significância estatística. Um efeito é, por conseguinte, significativo, se ele ultrapassa esta linha vertical.

Os modelos e diagramas de Pareto apresentados na Fig. 1 mostram que a concentração de biomassa inicial e/ou taxa de agitação são fatores que exercem efeitos significativos sobre a biodegradação do óleo diesel em água do mar por *C. lipolytica* UCP

0988. A análise dos resultados ilustrados na Figura 1 indica que: (i) o aumento da velocidade de agitação e o aumento da concentração inicial da biomassa exerceram efeitos positivos significativos sobre o aumento da concentração final de biomassa (ii) o aumento da velocidade de agitação e a interação entre a concentração inicial de biomassa e a taxa de agitação exerceram efeitos negativos significativos sobre o aumento do pH; (iii) o aumento da taxa de agitação, o aumento da concentração inicial da biomassa e a interação entre taxa de agitação e a concentração inicial da biomassa exerceram efeitos positivos significativos sobre o aumento da tensão superficial e (iv) o aumento de biomassa inicial e o aumento da taxa de agitação exerceram efeitos positivos significativos sobre o aumento da percentagem de biodegradação TPH, enquanto a interação entre a concentração inicial de biomassa e a taxa de agitação exerceu um efeito negativo significativo sobre o aumento da percentagem TPH biodegradação. Isto pode ser explicado de forma simples: quanto maior a taxa de agitação, maior a taxa de consumo de oxigênio, quanto maior população de leveduras inicialmente presentes no inóculo maior a taxa de consumo de óleo diesel.

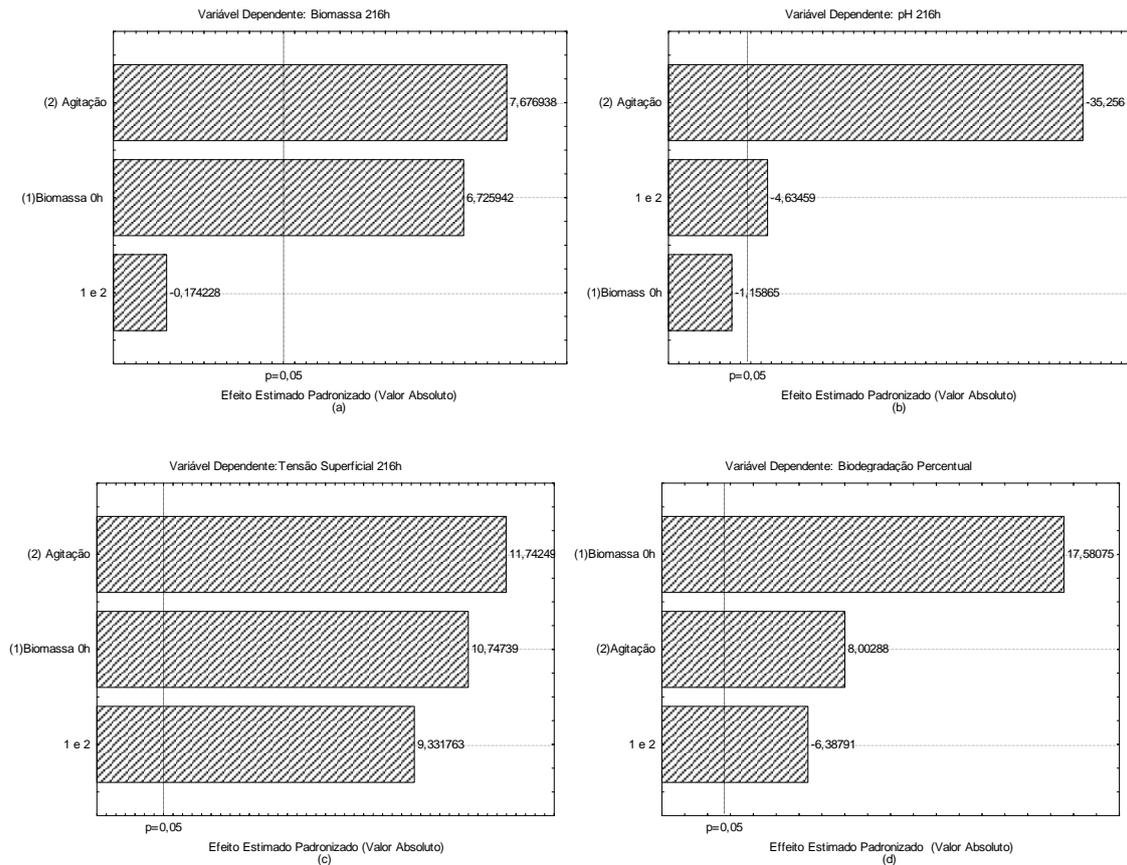


Figura 1 - Diagramas de Pareto de efeitos padronizados da concentração inicial de biomassa e da taxa de agitação sobre as variáveis dependentes do PFC 2² com 216 h : (a) biomassa (b) pH (c) tensão superficial e (d) percentagem de biodegradação de HTP. O ponto em que os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical tracejada.

A melhor condição para a biodegradação do óleo diesel no PFC 2² (Tabela 2) foi a usada no ensaio 4 e em sua réplica (ensaio 8): concentração de biomassa inicial igual a 0,636g/L e velocidade de agitação igual a 200 rpm. Estas condições foram consideradas como as mais favoráveis para a biodegradação do óleo diesel, porque apresentaram após 9 dias: (i) a maior biomassa, (ii) o menor pH, (iii) os maiores valores de atividade de emulsificação para emulsões formadas entre o líquido metabólico livre de células e o óleo diesel e entre o líquido metabólico livre de células e o óleo de milho e (iv) percentagem média de biodegradação do THP, sem diferença estatística significativa em relação ao ensaio 2, que apresentou o maior valor do PFC 2². Os perfis cinéticos do melhor ensaio

do PFC 2² e dos correspondentes controles negativo, positivo e abiótico, realizados nas mesmas condições do melhor ensaio, mas em um menor período de tempo (96 h), estão ilustrados na Figura 2.

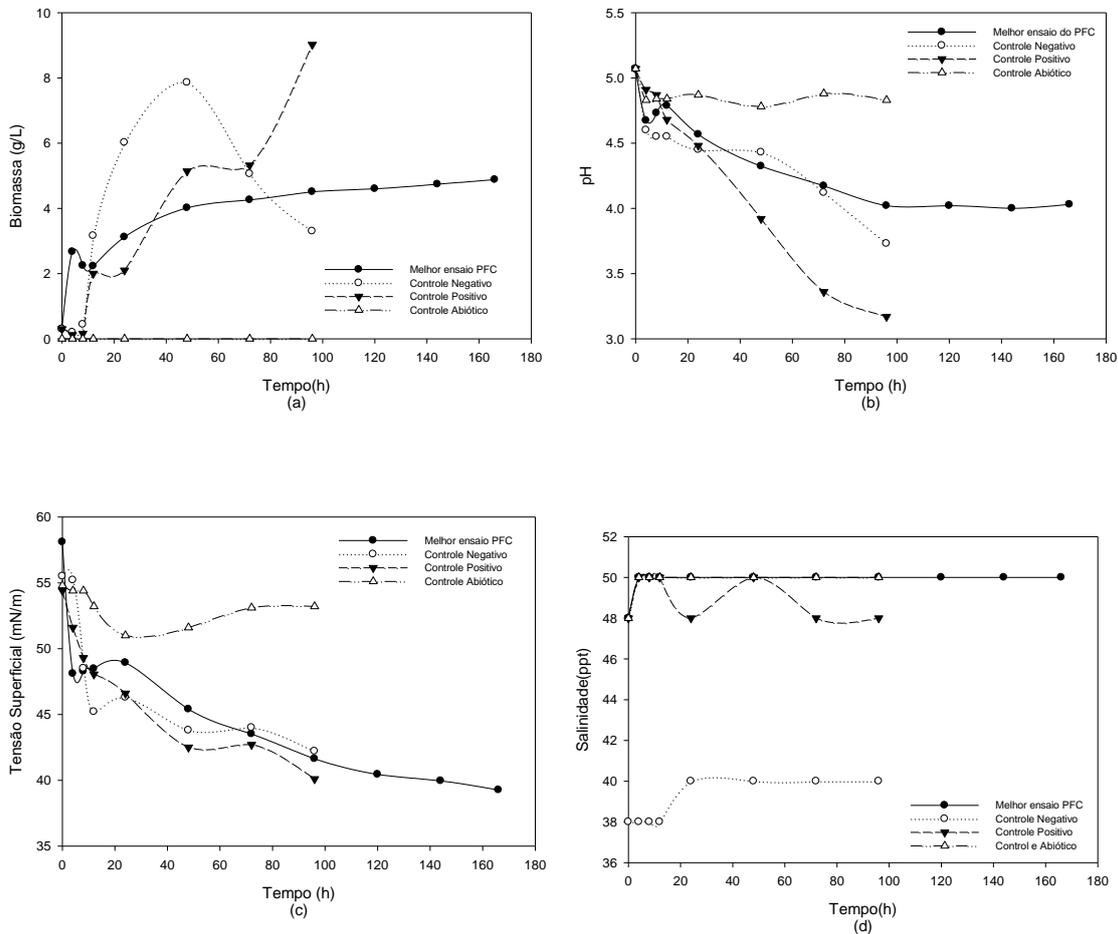


Figura 2 - Perfis cinéticos de: (a) biomassa (b) pH (c) tensão superficial e (d) salinidade para o ensaio 4 do PFC 2² e para os correspondentes controle negativo, positivo e abiótico.

Os perfis de crescimento do melhor ensaio e do ensaio negativo apresentaram correlação com a extensão da biodegradação de óleo diesel. A produção máxima (7,86 g/L) de biomassa foi obtida no controle negativo com 48 h, sugerindo a preferência de *C. lipolytica* UCP 0988 por meios com salinidade próxima a da água do mar. Após este tempo, a produção de biomassa no controle negativo diminuiu continuamente,

provavelmente devido a limitações de fontes de nitrogênio e de fósforo na água do mar. Por outro lado, no ensaio-teste (ensaio realizado nas mesmas condições do melhor ensaio do PFC 2²), a produção de biomassa atingiu 4,02 g/L, com 48 horas e continuou a aumentar até atingir cerca de 5,0 g/L no final do processo.

A suplementação da água do mar com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, no ensaio-teste, favoreceu a extensão do processo de biodegradação de óleo diesel. Diversos pesquisadores relataram uma melhor eficiência na biodegradação de hidrocarbonetos devido a adição de sais de nitrogênio e fósforo (Atlas e Bartha, 1984; Prince, 1993; Souza et. al, 2012).

O pH e a tensão superficial do experimento-teste e dos correspondentes controles - negativo e positivo – diminuíram continuamente, sugerindo a produção de ácido orgânico e biosurfactantes pela levedura durante o processo de biodegradação de óleo diesel. De acordo com Coelho et al., (2010), *Yarrowia lipolytica* apresenta a capacidade para produzir e secretar uma grande variedade de ácidos orgânicos, incluindo os intermediários do ciclo do TCA. As fontes de carbono utilizadas nestes processos podem ser, entre outros, n-alcenos, em condições de crescimento limitadas, causadas por diferentes fatores nutricionais, como fonte de nitrogênio, tiamina, fosfato ou compostos minerais (fósforo, magnésio, enxofre). Hassanshahian et al., (2012), isolaram e caracterizaram duas linhagens de leveduras degradadoras de óleo bruto a; *Yarrowia lipolytica* PG-20 e PG-32, do Golfo Pérsico, que tinham alta hidrofobicidade na superfície da célula e reduziram drasticamente a tensão superficial. Além disso, estas estirpes tinham um nível suficiente para a atividade de emulsificação com base em substratos de hidrocarbonetos.

A biodegradação do diesel foi confirmada pela redução da área sob os picos dos hidrocarbonetos dos cromatogramas, quando comparada com a do controle abiótico (sem organismos), o que sugere que a remoção de componentes de hidrocarbonetos de diesel variou de 7 a 13 átomos de carbono. A biodegradação de *n*-alcenos, alcenos ramificados e alcenos ramificados por *C. lipolytica* UCP 0988, em 0 e 216 h, está ilustrada na Figura 3.

Apenas os hidrocarbonetos alifáticos, identificados por análise de espectrometria de massa, que atingiram biodegradação percentual superior a 85%, considerando as perdas abióticas, encontram-se representados.

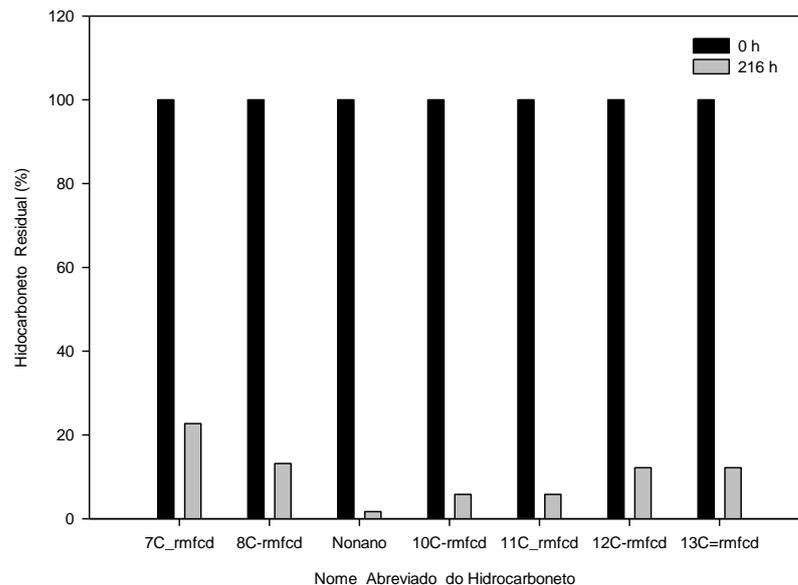


Figura 3. Concentrações residuais de heptano, 2,3,4-trimetil- (7C_rmfc); Octano, 2-metil- (8C_rmfc); Nonano; Decano,2-metil- (10C_rmfc); Undecano,4-metil (11C_rmfc); Dodecane, 2,7,10-trimetil- (12C-br); Tridecano, 3-metileno (13C = br) em 0h e 216 h.

O padrão de degradação mostra que a levedura *C.lipolytica* UCP 0988 utilizou preferencialmente o nonano e posteriormente cadeias de alcanos ramificados de comprimento médio. Ocorreu também biodegradação por *C.lipolytica* UCP 0988 de quantidade significativa de outros alcanos e utilização de frações de compostos aromáticos, sendo que estes últimos foram mais resistentes à biodegradação que os compostos alifáticos.

Muitos destes compostos, especialmente alcanos lineares, são facilmente biodegradáveis (Márquez-Rocha et. al, 2001). Trabalho desenvolvido por Miranda et al (2007) ratifica a preferência de leveduras degradadoras de óleo diesel por alcanos. A levedura *R. aurantiaca* UFPEDA 845 mostrou altas percentagens de degradação para

decano, nonano e dodecano (93,0%, 38,4%, e 22,9%, respectivamente), enquanto que *Candida ernobii* UFPEDA 862 degradou completamente, tetradecano, 5-metil-octano e octadecano, e parcialmente decano (60,8%) e nonano (21,4%).

Resultados semelhantes foram obtidos em processos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto, consistindo de bactérias e leveduras, nos quais os hidrocarbonetos nonano e decano foram os mais degradados, porém outros n-alcenos (undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, icosane e heneicosano) também apresentaram altas percentagens de biodegradação (Silva et. al, 2015).

Embora seja fato que geralmente alcenos ramificados são mais recalcitrantes do que seus equivalentes de cadeia linear, estudos têm demonstrado que muitos destes compostos foram mais degradáveis, do que havia sido relatado anteriormente (Geerdink et. al., 1996). Resultados obtidos por Gomes et al., (2009) mostraram ocorrência similar para uma cultura autóctone.

3.3 Segundo estágio - Biodegradação do óleo diesel em biorreator BIOFLO 2000 (5 L)

Um efetivo *scale up* é essencial para o sucesso do processo de biodegradação do óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar, portanto, na ampliação do processo para escala de biorreator de 5L, foram mantidos constantes, o máximo possível, diversos parâmetros ambientais e nutricionais. Assim, foram mantidas as concentrações iniciais de biomassa, diesel, sulfato de amônio e fosfato de potássio (Tabela 1) utilizadas no ensaio 4 - considerado o ensaio mais favorável para biodegradação de óleo diesel do PFC 2² (Tabela 2), realizado em escala Fernbach – e foram aumentadas apenas as taxas de agitação e de aeração, conforme descrito na Tabela 1.

O potencial de leveduras para metabolizar compostos hidrocarbonetos, inclusive em ambiente marinho, está bem estabelecido na literatura (Macgillivray; Shiaris, 1993; Zinjarde

et. al, 1997; Hassashanian et al 2012; Gargouri et al., 2015). Na Fig. 4 são apresentados os perfis cinéticos de produção de biomassa, nos processos de biodegradação do óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988, realizado em escala de Fernbach de 2,8 L e em escala de biorreator de 5L, durante 216h. Em ambas as escalas, *C.lipolytica* UCP 0988 apresentou crescimento diaúxico, sem fase de latência, e foi capaz de degradar hidrocarbonetos do MM, contendo 10% de óleo diesel B7. Estes resultados sugerem que o biodiesel como substrato tem uma prioridade de utilização por *C.lipolytica* UCP 0988 em relação ao óleo diesel. Trabalhos anteriores mostram que o biodiesel e as misturas de diesel com biodiesel, são mais fácil e rapidamente biodegradados do que o óleo diesel (Mariano et. al., 200; Bucker et. al, 2011). Comportamento de crescimento diaúxico semelhante foi exibido pela levedura *Rhodotorula aurantiaca* em meio mineral Bushnell-Hass, contendo 2-12% de óleo diesel, por um período de 20 dias (Miranda et al., 2007).

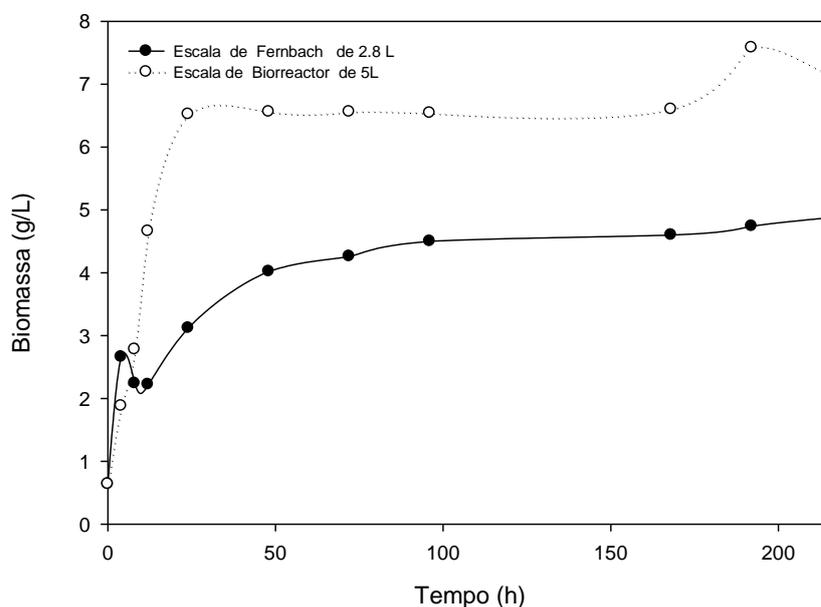


Figura 4 – Perfis cinéticos de biodegradação do óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar suplementado com sulfato de amônio e fosfato de potássio monobásico em: (i) escala 2.8.L Fernbach e (ii) em escala de bancada-biorreator 5 L.

Formações de biofilme, claramente visíveis a olho nu foram observadas nos espaços superiores (*headspaces*) das superfícies de vidro dos frascos de Fernbach e do biorreator de bancada e na tampa de aço inoxidável do biorreator, durante o processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* em cultivo submerso (Fig 5).



Figura 5 - Formação de biofilme em escala de frasco de Fernbach de 2.8.L e em escala de biorreator bancada de 5 L, durante processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio.

Esta constatação sugere que a *C. lipolytica* UCP 0988 adere a superfície do vidro e utiliza os nutrientes do biofilme e da água do mar para crescer e produzir polissacarídeos extracelulares (EPS), resultando na formação de microcolônias, que formam uma camada que cobre as superfícies laterais, acima do níveis dos cultivos submersos do frasco de Fernbach e do biorreator de bancada e também a tampa de aço inoxidável do biorreator. O biofilme formado na presença de hidrocarbonetos não-voláteis, voláteis e semi-voláteis do óleo diesel, acumula biomassa com grande espessura, que eventualmente, sofre descolamento da superfície de vidro e (re) inocula o cultivo submerso com células mais adaptadas à toxicidade química ambiental, aumentando a degradação dos hidrocarbonetos totais do óleo diesel. Uma pesquisa mais detalhada sobre a formação, a composição da

matriz, as interações, a atividade e os padrões de expressões genéticas específicas do biofilme, entre outras propriedades e mecanismos importantes, já foi iniciada e será publicada em futuro próximo.

Estudos envolvendo degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por leveduras e formação de biofilme ainda são escassos na literatura. Utilização de *Candida tropicalis* e formação de biofilme em processos de recuperação de óleo diesel foi investigada por Das e Chandran (2011). O biofilme formado pela levedura sobre cascalho mostrou 97% de degradação do óleo diesel durante um período de 10 dias. Segundo os autores, uma vez que os biofilmes de levedura 'artificialmente' formados, podem degradar eficientemente o óleo diesel sob condições de laboratório, eles também podem desempenhar um papel importante na biorremediação de resíduos líquidos contendo hidrocarbonetos. Cong et al (2014) investigaram a formação de biofilme por uma mistura de leveduras isoladas no Vietnã para degradar hidrocarbonetos aromáticos de águas residuais poluídas, recolhidas a partir do armazenamento de petróleo. O biofilme formado por uma mistura destes organismos degradou 90, 85, 82 e 67% de fenol, naftaleno, antraceno e pireno, respectivamente, após um período de incubação de 7 dias, utilizando uma concentração inicial de 600 ppm de fenol e 200 ppm de cada um dos outros compostos. Para os autores, os resultados obtidos indicam que o biofilme formado por várias cepas de leveduras (*Candida viswanathii* TH1, *Candida tropicalis* TH4 e *Trichosporon asahii* B1) pode aumentar consideravelmente a eficiência de degradação de compostos de hidrocarbonetos aromáticos e pode levar a uma nova abordagem para a eliminação de água contaminada com petróleo no Vietnã.

Perfis cromatográficos, obtidos a partir das amostras coletada durante o processo de biodegradação, com 0 h e 216 h, contendo óleo diesel B7 à 10% (v/v), incubadas sem inóculo (Fig.6a-b) e com inóculo (Fig.6c-d) de *C.lipolytica* UCP 0988, permitem a comparação da intensidade dos picos das amostras controle e teste analisadas. Os hidrocarbonetos resolvidos aparecem como picos e os hidrocarbonetos não resolvidos

aparecem como a área entre a linha de base mais baixa e a curva, definindo a base de picos resolvidos. Picos mais altos representam os n-alcenos e os picos entre os mesmos, representam os compostos aromáticos (incluindo naftalenos e alquilbenzenos). À abundância do pico mais alto foi atribuído o valor 100, e as alturas dos outros picos foram comparadas com o pico mais alto para dar a abundância relativa dos ensaios. Os resultados mostram reduções na intensidade dos picos de hidrocarbonetos das amostras de controle abióticos, quando comparado com as amostras de teste bióticos.

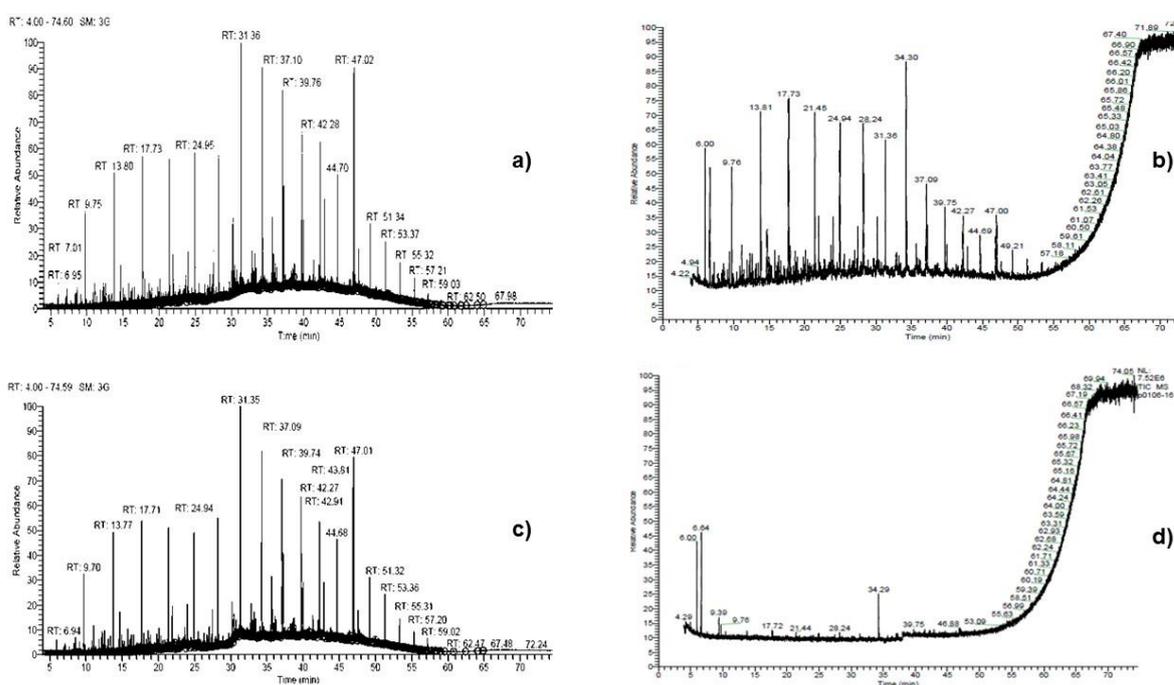


Figura 6 - Análise de GC-MS de biodegradação de 10% (v / v) de óleo diesel em B7 5L biorreactor por *C. lipolytica* UCP 0988. (a) amostra abiótica controle em 0h, (b) amostra do controle abiótico em 216h, (c) amostra do teste Biotico às 0h e (d) amostra de teste biotico a 216 h

A análise por GC / MS detectou os seguintes melhores picos resolvidos na amostra:

a) Controle Abiótico 0h: Heptano, 2,6-dimetil; Nonano; Decano; Undecano; Tetradecano; Pentadecano; Heptadecano; Heptadecano; Eicosano; Ácido Hexadecanóico, metil ester; Heptadecano, 9-hexil; Eicosane, 2-metil-; trans-13- Ácido Octadecenóico; Heptadecano, 2,6,10,15-tetrametil; Nonadecano, 2-metil; Eicosano, 10-metil; Eicosano, 10-metil; Heptadecano, 9-hexil-; Octadecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)- (Fig 6a).

(b) Controle Abiótico 216 h: Cyclohexano, 1,2-dimetil-, cis; Heptano, 2,6-dimetil; Heptano, 2,6-dimetil; Nonano; Decano; Undecano; Tridecano; Pentadecano; Heptadecano; Eicosano; Eicosano; Ácido Hexadecanóico, metil ester; Eicosano; 11- Ácido Octadecenóico, metil ester, (Z)-; Nonadecano, 2-methyl; Eicosano, 10-metil ; Heneicosano 11-(1-etilpropil); Heptadecano, 9-octil; Octadecano, 3-etil-5-(2-etilbutil (Fig.6b).

(c) Teste biótico 0h: 1-Undecin-4-ol; Octano (C₁₁H₂₀O), 2,4,6-trimetil- (C₁₁H₂₄); Decano (C₁₀H₂₂); Undecano (C₁₁H₂₄); Decano, 2,4,6-trimetil (C₁₃H₂₈); Decano, 2-metil- (C₁₁H₂₄); Tetradecano, 2,6,10-trimetil- (C₁₇H₃₆); Heptadecano, 2,6-dimetil- (C₁₉H₄₀); Tetradecano, 2,6,10-trimetil (C₁₇H₃₆); Tetradecano, 2,6,10-trimetil- (C₁₇H₃₆); Ácido Ciclopropanepentanóico acid, 2-undecil-, metil ester, trans- (C₂₀H₃₈O₂); 1-Iodo-2-metilundecane (C₁₂H₂₅I).

(d) Teste Biótico 216h b: (Replicata 1) Octano (C₈H₁₈); Ácido Acético; butil ester (C₆H₁₂O₂); 10-Clorotriciclo[4.2.2.0(1,5)]dec-7-ene (C₁₀H₃Cl); Tetradecano, 2,6,10-trimetil- (C₁₇H₃₆); (Replicata 2) Hexano, 2,4-dimetil- (C₈H₁₈); Ácido Acético, butil ester (C₆H₁₂O₂); Spiro[2.4]heptano, 1-etenyl-5-(1-propenilideno) (C₁₂H₁₆); 1-Iodo-2-metilundecano (C₁₂H₂₅I); (Replicata 3) Octano (C₈H₁₈); Ácido Acético, butil ester (C₆H₁₂O₂); o-xileno (C₈H₁₀); 1-Iodo-2-metilundecane (C₁₂H₂₅I); (Replicata 4) Octano (C₈H₁₈); Ácido Acético, butil ester (C₆H₁₂O₂); Benzeno, 1,3-dimetil- ((C₈H₁₀); 4-Etil-1-hexin-3-ol (C₈H₁₄O); Dodecano, 2,6,11-trimetil (C₁₅H₃₂).

A levedura *C. lipolytica* UCP0988 mostrou capacidade de utilizar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de óleo diesel. Após 9 dias, o número de picos resolvidos de hidrocarbonetos foi reduzido de 12 (Fig. 6 C) para 4 (Fig. 6d), com degradação quase total de alcanos ramificados e não ramificados, dentro do intervalo de 11 a 20 átomos de carbono. No entanto, alguns hidrocarbonetos alifáticos com 8, 10, 12, 15 e 17 átomos de carbono e compostos aromáticos como xileno foram resistentes a biodegradação nas condições estudadas. A não habilidade da levedura produzir enzimas apropriadas para degradar estes compostos recalcitrantes e/ou a conversão dos compostos intermediários em compostos mais complexos encontram-se entre as explicações mais prováveis para estes resultados.

As reduções nas intensidades e no número dos picos de hidrocarbonetos obtidos nas amostras de teste biótico em relação às amostras de controle abiótico foram estatisticamente significativas (teste t, p > 0,05). Em comparação com a amostra de teste biótico em 0h (Fig. 6c), o total hidrocarbonetos resolvidos e as frações da mistura complexa não resolvida (MCNR) são, respectivamente, menor e maior, na amostra de teste biótico em

216 h (Figura 6d), que é um outro indicativo de biodegradação. Este achado está de acordo com observações feitas por Mariano et al., (2008) em trabalho correlato sobre biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado. Quatro repetições da amostra de teste biótico em 216 h foram realizadas e os resultados cromatográficos obtidos foram confirmados.

Hidrocarbonetos aromáticos são conhecidos por serem mais resistentes à biodegradação que os compostos alifáticos e são frequentemente um sério problema durante o processo de biorremediação. Gargouri et al., (2015) isolaram e caracterizaram cepas de leveduras degradadoras de hidrocarbonetos de águas residuais industriais contaminadas por petróleo, que também mostraram degradação preferencial por alcanos e compostos aromáticos. Os autores relataram que a estirpe de levedura *Candida species* HC1 foi capaz de degradar uma mistura hidrocarbonetos aromáticos de baixo e elevado peso molecular e eficiência de degradação foi observada para antraceno (51%) e fluoranteno (74%), com 7 dias.

O interesse por leveduras degradadoras de óleo diesel têm aumentado devido aos bons resultados científicos e biotecnológicos relatados na literatura. Chandran e Das (2011) relataram que células livres de *Candida tropicalis* foram capazes de degradar 80% de óleo diesel, durante o período de uma semana. Palanisamy et al., (2014), mostraram que *A. baumannii* foi capaz de degradar mais do que 99% do óleo diesel, em um período de 5 dias de incubação, a 28 ° C e pH inicial 5. Em pesquisa anterior, relatada pelo mesmo autor, degradação de óleo diesel de 95,01% foi alcançada por *Trichosporon asahii*.

No presente estudo, no processo de biodegradação do óleo diesel por *C.lipolytica* em água do mar simulado em escala de frasco de Fernbach de 2.8L durante 216h, um total de 7 hidrocarbonetos alifáticos - identificados por análise de espectrometria de massa como sendo: heptano, 2,3,4-trimetil- (7C_br) ; Octano, 2-metil- (8C_br); nonano; Decano, 2-metil- (10C_br); Undecano, 4-metil (11C_br); Dodecane, 2,7,10-trimetil- (12C-br); Tridecano, 3-metileno (13C = br) - atingiu percentual de degradação superior a 85%, considerando as

perdas abióticas. No mesmo processo simulado em escala de biorreator de bancada de 5 L, foi detectada a degradação completa (100%) de 6 hidrocarbonetos alifáticos - identificados por análise de espectrometria de massa como sendo: 2,4,6-trimetil- ($C_{11}H_{24}$); decano; undecano; Decano, 2,4,6-trimetil; Decano, 2-metil- e heptadecano, 2,6-dimetil-. Também foram identificadas degradações parciais de outros hidrocarbonetos. Em ambas as escalas, compostos aromáticos foram mais resistentes à biodegradação do que os compostos alifáticos.

Os resultados obtidos mostram que o estabelecimento da taxa de aeração em 0,875 vvm e o aumento da velocidade de agitação de 250 rpm - em escala de Fernbach - para 300 rpm - em escala biorreactor 5L - favoreceu a biodegradação óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Amaral et al., (2006), e Fontes et al., (2010), nos quais foram verificados aumentos da produção de biossurfactantes em taxas de agitação e aeração elevadas, devido provavelmente ao aumento da eficiência de transferência de massa de ambas, as moléculas de oxigênio e de componentes do meio MM-YSW, considerados cruciais para o crescimento celular e para a formação de biossurfactante por *Y. lipolytica* IMUFRJ 506.682.

Na estratégia de *scale up* em dois estágios adotada neste trabalho, a levedura *C. lipolytica* UCP 098 usando o óleo diesel B7 como única fonte de carbono e energia, sintetizou 5,0 g/L de massa celular, após 9 dias de cultivo em escala de frasco Fernbach e 7,2 g/L em escala de biorreator de 5L. A biodegradação de compostos de hidrocarbonetos foi verificada em escala de frascos de Fernbach e em escala de biorreator de bancada. O pH, a salinidade, a tensão superficial e a atividade de emulsificação para emulsões com n-hexadecano, o óleo diesel e óleo de milho foram respectivamente iguais a: 3,3; 47 ‰; 38,36 mN/m, 4.416 UEA; 4,409 UEA e 4.024 UAE. Os resultados também indicam que a concentração inicial de biomassa (inóculo), condições nutricionais e operacionais tiveram um papel importante na biodegradação de petróleo B7 diesel. Portanto, pode-se considerar

que a biodegradação de óleo diesel B7 por *C.lipolytica* UCP 0988 em água do mar foi realizada com sucesso no bioreator de bancada de 5L usado neste estudo.

Conclusão

A ampliação de processo de biodegradação do óleo diesel por *C. lipolytica* em água do mar foi realizada com sucesso. Durante a biodegradação de óleo diesel, as condições operacionais e nutricionais do processo não sofreram alterações substanciais devido à ampliação da escala de frascos para à escala de biorreator de bancada. A concentração inicial de biomassa e a taxa de agitação são fatores-chaves para aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos durante a ampliação de escala do processo de biodegradação do óleo diesel por *C.lipolytica* em água do mar. A levedura *C.lipolytica* UCP 0988 tem potencial para utilizar óleo diesel como única fonte de carbono e energia. Os componentes de óleo diesel mais degradados foram os n-alcenos. Alguns dos hidrocarbonetos aromáticos foram convertidos em produtos intermediários. Novos estudos são necessários para estabelecer os efeitos dos compostos aromáticos. O biofilme formado por *C. lipolytica* UCP 0988 pode aumentar consideravelmente a eficiência da degradação de compostos de hidrocarbonetos e levar a uma nova abordagem para a biorremediação *ex-situ* de água do mar contaminada por óleo diesel.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FACEPE, CNPq, CAPES e UNICAP.

Referências

Amaral, P. F. F., Da Silva, J. M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A. M. V., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A. P. (2006). **Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica***. Process Biochemistry, 41(8): 1894-1898, DOI: 10.1016/j.procbio.2006.03.029.

Atlas, R. M. (1984). **Pathways of microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective.** *Microbial Reviews*, 45: 180-209.

Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. D. C. R., de Oliveira Camargo, F. A., Bento, F. M. (2011). **Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1): 172-178, DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.09.008

Cerniglia, C. E., Crow, S. A. (1981). **Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts.** *Archives of Microbiology*, 129(1): 9-13, DOI: 10.1007/BF00417170

Chandran, P., Das, N. (2011). **Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels.** *Biodegradation*, 22(6): 1181-1189, DOI: 10.1007/s10532-011-9473.

Charles, M. (1985). **Fermentation scale up: problems and possibilities.** *Trends in Biotechnology*, 3(6): 134-139, DOI: 10.1016/0167-7799(85)90101-5.

Cirigliano, M. C., Carman, G. M. (1984). **Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4): 747-750.

Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F Amaral, Belo, I. (2010). ***Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse.** *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* Méndez-Villas A, editor, VOL. 2, Badajoz: Formatex, pp. 930-944. ISBN (13): 978-84-614-6195-0

Cong N.T.L, Ma, C. T. N., Thanh, V. T., Minh, N. N. (2014). **Application of a biofilm formed by a mixture of yeasts isolated in Vietnam to degrade aromatic hydrocarbon polluted wastewater collected from petroleum storage.** *Water Science & Technology*, 70(2): 329-336

Cooper, D. G., Goldenberg, B. G. (1987). **Surface-active agents from two *Bacillus* species.** *Applied and environmental microbiology*, 53(2): 224-229.

Fontes, G. C., Ramos, N. M., Amaral, P. F. F., Nele, M., Coelho, M. A. Z. (2012). **Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(3): 483-494, <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322012000300005>.

Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., & Sayadi, S. (2015). **Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater.** *BioMed research international*, 2015, 1, DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/929424>.

Geerdink, M. J., Kleijntjens, R. H., Loosdrecht, M. V., Luyben, K. C. A. (1996). **Microbial decontamination of polluted soil in a slurry process.** *Journal of Environmental Engineering*, 122(11): 975-982, ISSN (print): 0733-9372.

Gomes, E. B., Silva, R. F., Rosado, A. S., Pereira, N. (2010). **Biotreatment of diesel waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR).** *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(5): 413-417, DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.04.003.

Hassanshahian, M., Tebyanian, 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(7): 1386-1391, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.04.020.

Henriques, M.L.O.M. (2013) **Diesel Oil Biodegradation Optimization *Candida lipolytica* in seawater.** Thesis (MS), UNICAP, Recife, Brazil.

Hou, D., Shen, X., Luo, Q., He, Y., Wang, Q., Liu, Q. (2013). **Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material.** Marine pollution bulletin, 67(1): 146-151, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.11.021.

Kutty, S. N., Philip, R. (2008). **Marine yeasts—a review.** Yeast, 25(7): 465-483, DOI: 10.1002 / yea.1599.

MacGillivray, A. R., Shiaris, M. P. (1993). **Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments.** Applied and environmental microbiology, 59(5): 1613-1618.

Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. D. F. D., Pirôllo, M. P. S., & Contiero, J. (2008). **Biodegradability of commercial and weathered diesel oils.** Brazilian Journal of Microbiology, 39(1): 133-142, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100028>.

Márquez-Rocha, F. J., Hernández-Rodríguez, V., & Lamela, M. T. (2001). **Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium.** Water, Air, and Soil Pollution, 128(3-4), 313-320, DOI: 10.1023 / A: 1010392821353.

Miranda, R. D. C., Souza, C. S. D., Gomes, E. D. B., Lovaglio, R. B., Lopes, C. E., Sousa, M. D. F. V. D. (2007). **Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the state of Pernambuco-Brazil.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 50(1): 147-152, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000100018>.

Moscoso, F., Deive, F. J., Longo, M. A., Sanromán, M. A. (2015). **Insights into polyaromatic hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930: operation at bioreactor scale and metabolic pathways.** International Journal of Environmental Science and Technology, 12(4): 1243-1252, DOI: 10.1007/s13762-014-0498-y.

Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N. S., Chandran, P., Khan, S. (2014). **Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil.** Journal of Environmental Health Science and Engineering, 12(1): 1-8, DOI: 10.1186/s40201-014-0142-2.

Paniagua-Michel, J., Rosales, A. (2015). **Marine Bioremediation-A Sustainable Biotechnology of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Coastal and Marine Environments.** Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2015.

Prince, R.C. (1993). **Petroleum Spill Bioremediation in Marine Environments.** Critical reviews in microbiology, 19(4): 217-240, DOI:10.3109/104084193091135.

Seger, F. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar hipersalina e extremamente ácida.** Thesis (MS), UNICAP, Recife, Brazil.

Sharma, A., Kumar, P., & Rehman, M. B. (2014). **Biodegradation of diesel hydrocarbon in soil by bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa*: A laboratory scale study.** International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, 2(4): 202-212, DOI: 10.12691/ijebb-2-4-8

Shuler F.L., Kagi, F. (1992). **Bioprocess Engineering: Basics Concepts.** (Chapter 10), Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, ISBN-10: 0130819085.

Silva, D. D. S. P., de Lima Cavalcanti, D., de Melo, E. J. V., dos Santos, P. N. F., da Luz, E. L. P., de Gusmão, N. B., de Queiroz, M. D. F. V. (2015). **Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment.** International Biodeterioration & Biodegradation, 97, 85-89, DOI:10.1016/j.ibiod.2014.09.021.

Singh, P., Cameotra, S. S. (2004). **Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences.** Trends in Biotechnology, 22(3): 142-146, DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.01.010.

Souza, F. A. S. D., Salgueiro, A. A., Albuquerque, C. D. C. (2012). **Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 29(1): 61-67, <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322012000100007>.

Usharani, K., & Muthukumar, M. (2013). **Optimization of aqueous methylparathion biodegradation by *Fusarium sp* in batch scale process using response surface methodology.** International Journal of Environmental Science and Technology, 10(3): 591-606, DOI: 10.1007 / s13762-012-0144-5.

Zaky, A. S., Tucker, G. A., Daw, Z. Y., Du, C. (2014). **Marine yeast isolation and industrial application.** FEMS yeast research, 14(6), 813-825, DOI: doi: 10.1111 / 1567-1.364,12158

Zhenle, T., Lihua, Z., Yinghui, W., Heqing, T. (2006). **Evaluation of biodegradation of petroleum hydrocarbons pollutants by gas chromatography and spectrophotometry.** Chinese Journal of Analytical Chemistry, 34(3): 343.

Zhou, Q. H., Kosaric, N. (1995). **Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*.** Journal of the American Oil Chemists Society, 72(1): 67-71, DOI: 10.1007/BF02635781.

Zinjarde, S. S., Pant, A., Deshpande, M. V. (1998). **Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water.** Mycological research, 102(05): 553-558, DOI: 10.1017 / S0953756297005418.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

- A alta salinidade exerce efeito inibitório sobre o crescimento das células e sobre a biodegradação de hidrocarbonetos do óleo diesel, entretanto, sendo uma levedura marinha facultativa, *C. lipolytica* UCP 0988 adapta seus sistemas biológicos e fornece respostas de defesa efetivas ao estresse salino;
- As alterações fisiológicas e os produtos (biossurfactantes/bioemulsificantes, entre outros) sintetizados para manter o crescimento celular e sobrevivência em ambiente aquático hipersalino, contaminado com óleo diesel, favorecem o crescimento celular e a absorção e biodegradação de hidrocarbonetos de diesel por *C. lipolytica* UCP 0998, nas condições investigadas;
- A ampliação do processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988, em água do mar, da escala de frascos para escala de biorreator de bancada foi eficaz e pode facilitar a ampliação do processo para escalas maiores ;
- O aumento da agitação e da aeração favoreceram o aumento de biomassa, que por sua vez, exerceu um efeito significativo sobre o aumento da biodegradação dos hidrocarbonetos do diesel;
- A quantidade de hidrocarbonetos do óleo diesel em biorreator de bancada teve expressiva redução, que foi favorecida pela formação de biofilme;
- Biofilmes de levedura 'artificialmente' formados, podem influenciar positivamente na biodegradação o óleo diesel sob condições de laboratório, desempenhando importante papel na biorremediação de resíduos líquidos contendo hidrocarbonetos.
- Pesquisa sobre a composição do biofilme formado pela levedura *C.lipolytica* UCP 0988 e de sua efetiva aplicabilidade são importantes para a modelagem e otimização do processos de biodegradação de hidrocarbonetos em água do mar.

ANEXOS

ANEXO I: Resumen publicado en *Book of Abstracts*. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015, Barcelona: Formatex Press, 2015, v.1, p. 113.



Book of Abstracts

VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015
Barcelona (Spain), 28-30 October 2015



Effect of salinity on diesel biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988

H.F. Nobrega; F. Seger; A. M.A.B. Correia; M.L.O.M.F. Henriques; G.M. Campos-Takaki; C.D.C. Albuquerque

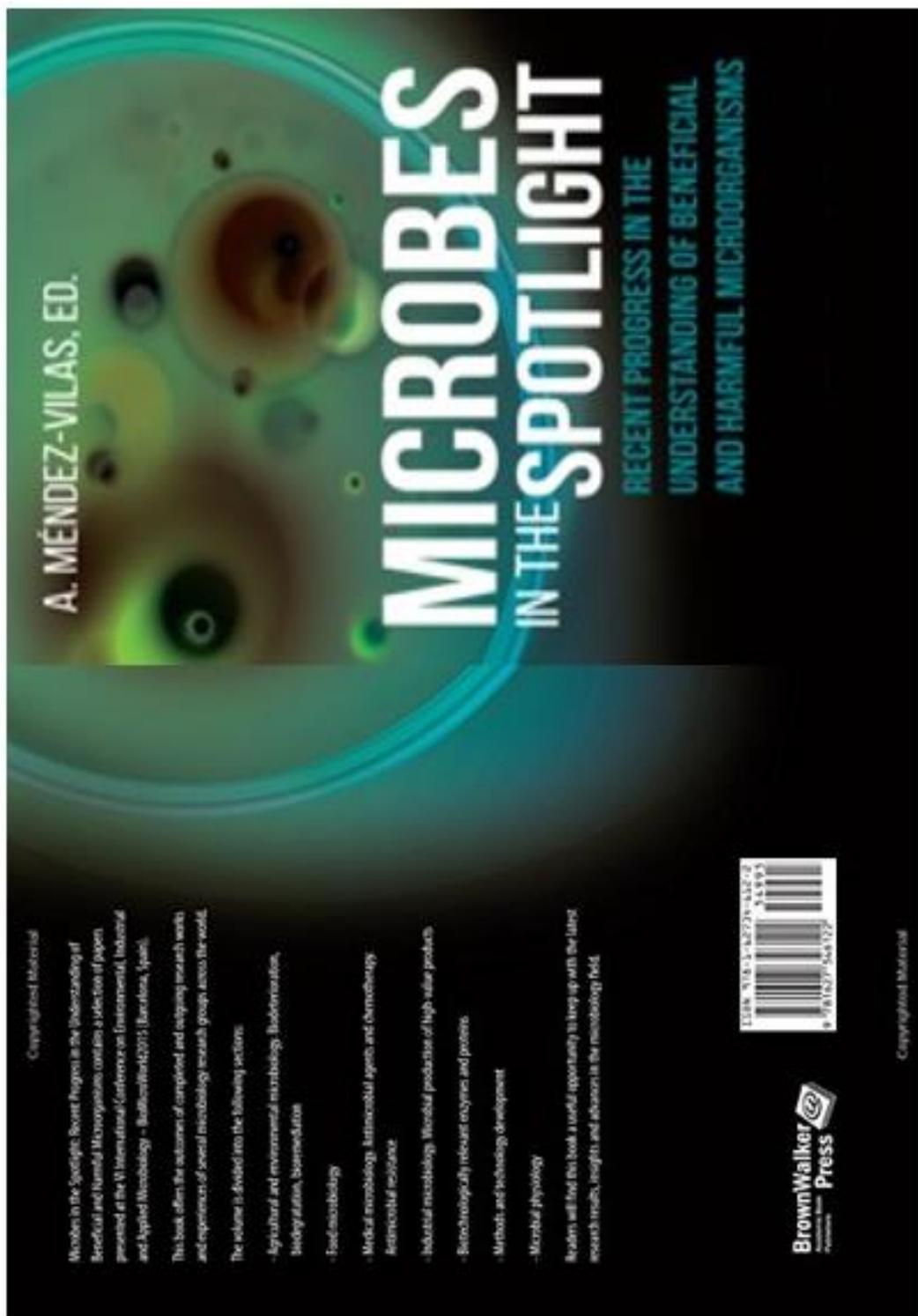
Nucleus of Research in Environmental Sciences, Center of Sciences and Technology Center, Catholic University of Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050-590, Recife, PE, Brazil.

There are few studies in the literature on the effects of salinity on biodegradation of diesel in seawater by yeasts. In this work, the effect of salinity on the biomass production, pH and surface tension in diesel oil biodegradation process by *Candida lipolytica* UCP 0988 was investigated. Two shake flask scale experiments were carried out in triplicate, using as diluents seawater and distilled water, contaminated with diesel oil (10% v/v) and supplemented with ammonium sulfate and potassium dihydrogen phosphate. Abiotic sterile, negative (without supplement of nutrient salts) and positive (substituting diesel oil by corn oil) control experiments were performed for each test experiment. All experiments were carried out at 28 °C and 200 rpm, in 500 mL Erlenmeyer flasks with a working volume of 250 mL, for a 96 h incubation period. Kinetic profiles of biomass formation, pH and surface tension were constructed. A direct comparison between the diesel biodegradation profiles of the test and control experiments using distilled and sea water were performed. The kinetic profiles of biomass production indicate that *C. lipolytica* presents diauxic growth behavior and significant differences in degradation rates during the diesel oil degradation, in both seawater and distilled water. The salinity effect reduced but did not inhibit diesel biodegradation, which was favored by the increased time. The results obtained can help the understanding and development of effective methods for diesel oil bioremediation in oceans and seas.

Keywords microbial degradation, hydrocarbon, surface tension, seawater, distilled water

Financial Support: FACEPE, UNICAP

ANEXO II: Artigo publicado no Book *Microbes in the spotlight: Recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. 1ed. Boca Raton, Florida, USA: BrownWalker Press, 2016, v.1, p. 75-79.



Effect of salinity on diesel biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988

H.F. Nobrega, F. Seger; A. M.A.B. Correia; M.L.O.M.F. Henriques; G.M. Campos-Takaki and C.D.C Albuquerque*

Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Sciences and Technology Center, Catholic University of Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050–590, Recife, PE, Brazil. *Corresponding author: e-mail: cdaisy@unicap.br, Phone: +55 81 21194012

In this work, the effect of salinity on the biomass production, pH and surface tension in the diesel oil biodegradation process by *Candida lipolytica* UCP 0988 was investigated. Two shake flask scale experiments were carried out in triplicate, using as diluents seawater and distilled water, contaminated with diesel oil and supplemented with ammonium sulfate and potassium dihydrogen phosphate. Abiotic sterile, negative and positive control experiments were performed for each test experiment. Kinetic profiles of biomass formation, pH, salinity and surface tension were constructed and analyzed. Comparisons among the diesel biodegradation results of test and control experiments using distilled and sea water were performed. The kinetic profiles of biomass production indicate that that *C. lipolytica* presents diauxic growth behavior and significant differences in degradation rates during the diesel oil degradation, in both seawater and distilled water. The salinity effect reduced but did not inhibit diesel biodegradation, which was favored by increased time.

Keywords microbial degradation, hydrocarbon, surface tension, seawater, distilled water

1. Introduction

In the second decade of the 21st century, the world is still fossil-fuel energy dependent and the sea's and ocean's pollution due to spill of crude oil and refined petroleum products (such as gasoline, kerosene and diesel) continues to be one of the biggest environmental problems. When oil is discharged into the seawater, it is subjected to several physicochemical and biological processes. Among those, biodegradation plays an important role. Considerable effort has gone into understanding the effect of temperature, oxygen and nutrients (N and P) concentrations on the rate and the mechanisms of biodegradation. However, little information is available on the role of salinity on petroleum biodegradation [1-3]. Natural seawater has a highly variable chemical composition [4], containing more than 50 elements and a large number of organic compounds. Marine culture media can be divided into two groups: natural and artificial seawater. Both natural and artificial seawater are unenriched media and shared similar problems with regard to culture requirements; for example macronutrients, such as nitrogen and phosphorus, or trace metals may be limiting [5]. There are few studies in the literature on the effects of salinity on diesel oil biodegradation in seawater by yeasts. In the present study, natural seawater and distilled water contaminated with diesel oil were supplemented with nitrogen (ammonium sulphate) and phosphorus (potassium monobasic phosphate), in order to stimulate cell growth and then evaluate the effects of salinity on the pH, surface tension and biomass production in the *C. lipolytica* UCP 0988 diesel oil biodegradation processes.

2. Material and methods

2.1 Microorganism

C. lipolytica UCP 0988 was obtained from the Culture Collection of the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, at the Catholic University of Pernambuco, Recife, State of Pernambuco, Brazil, registered in World Federation Culture Collection (WFCC). The yeast was maintained at 4°C in Yeast Mold Agar (YMA) medium with the following composition: yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, glucose 10 g/L, tryptone 5 g/L, agar 15 g/L and pH 5.

2.2 Diesel oil

Petrobras diesel oil, B7 metropolitan type (blend diesel/7% biodiesel), maximum of 0.05% sulfur; with additives; contains paraffinic, naphthenic and aromatic hydrocarbons (10 to 40%).

2.3 Sea Water

The seawater was collected in Suape Harbor, Pernambuco, Brazil. Its composition was Ca⁺⁺ 1.00%; Mg⁺⁺ 0.97%; Na⁺ 11.13%, K⁺ 0.88%, Cl⁻ 20.50%, SO₄⁻⁻ 3.41%. The salinity, specific gravity, pH and surface tension were equal to 37‰; 1026 kg/m³, 8.22 and 53.43 mN/m, respectively.

2.4 Test and control experiments for diesel oil biodegradation

Two test assays with media for B7 metropolitan diesel oil biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988, based in seawater (TA-SW) and in distilled water (TA-DW) were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks with a working volume of 250 mL, on a rotatory shaker at 200 rpm and 28°C, during 96 h. The medium components, ammonium sulphate and monobasic potassium phosphate were dissolved in sterile seawater or sterile distilled water. Initial concentrations of ammonium sulfate and monobasic potassium phosphate were equal to 2 and 13 g/L, respectively. The initial pH, the initial biomass (inoculum) and the initial diesel oil concentration were respectively equal to 5; 0.424 g / L and 10% (v/v). For the 96h-TA-SW, four control assays were performed: positive control consisting of sea water, corn oil, nutrients and inoculum (PC-SW); negative control consisting of seawater, diesel oil and inoculum (NC-SW) and kerosene control consisting of seawater, kerosene, nutrients and inoculum (KC-SW) and the abiotic control consisting of seawater, diesel oil and nutrients (AC-SW). The positive control served as a point of reference for reproducible biodegradation under optimal (nontoxic) conditions. The negative control served as a point of reference for reproducible biodegradation under sub-optimal conditions (nutrient limitation). The control with kerosene served as point of reference for reproducible biodegradation under toxic conditions. The abiotic control served to measure abiotic losses (i.e. additional volatilization losses and dissolution). Positive (PC-DW), negative (NC-DW), kerosene (KC-DW) and abiotic (AC-DW) controls using distilled water in place of sea water were also analyzed with 96 h to verify the salt effects on biodegradation of diesel oil. All experiments were carried out in triplicate.

2.5 Kinetics of environmental variables in diesel biodegradation in seawater and distilled water

The kinetics of the salinity, pH, surface tension and biomass production in the diesel oil biodegradation process by *C. lipolytica* UCP 0988, using as diluent seawater or distilled water were monitored during 4 days. Triplicate aliquots were collected at 0, 4, 8, 24, 48, 72 and 96h, from each of the experiments and submitted to analytical determinations.

2.6 Analyses

Measurement of biomass concentration was performed gravimetrically. The residual oil was extracted from biomass using chloroform (CHCl₃) and methanol (CH₃OH) at a ratio of 10: 1 [6]. The pH of the aliquots of seawater and cell-free metabolic liquids were determined using an Orion potentiometer (Model 310) (Orion Research Inc., Cambridge, MA, USA). The salinity and the specific gravity of sea water and the cell-free cultures were determined using hand-held salinity refractometer without automatic temperature compensation, range between 0 and 100‰ of salinity and 1000 to 1070, specific gravity, resolution 0.7%. The surface tension (ST) was determined on cell-free metabolic liquid, obtained by centrifugation (10,000× g for 15 min) and subsequent filtration of cultures, using a tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Finland) by the Du Nouy ring method [6] at room temperature (28°C).

3. Results and discussion

3.1 Growth kinetics of *C. lipolytica* 0988 in diesel oil biodegradation in seawater and distilled water

The kinetic profiles of biomass production in the TA-SW and TA-DW are presented in Figure 1. *C. lipolytica* UCP 0988 presented unconventional growth cycles in the TA-SW and TA-DW. In the studied conditions, the physiologic regulation of this yeast leads to diauxic growth. The results suggest that biodiesel has a substrate priority of utilization by *C. lipolytica* UCP 0988 than diesel oil. The B7 metropolitan diesel oil was metabolized

in a sequential manner. The presence of 7% biodiesel in the metropolitan oil diesel may have led to repression of the enzymes for metabolism of diesel oil. Therefore, only when the concentration of the biodiesel has been reduced through yeast consumption could the enzymes for metabolism of the diesel oil be produced. Previous works related to the biodegradation of biodiesel and diesel blends, and mainly focused on the water contamination, have demonstrated that biodiesel and the biodiesel/diesel blends are more easily and faster biodegraded than diesel oil [7]. Other possible explanations to diauxic growth are: (i) the transitory accumulation of a metabolite, which will eventually serve as a secondary nutritional source, (ii) the change in the composition of the cells themselves and (iii) emergence and coexistence in biodegradation media of two stable cell types with alternative metabolic strategies [8-9].

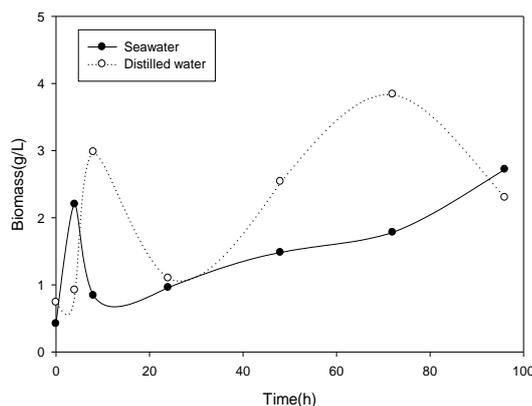


Fig. 1 Biomass production in media for diesel biodegradation using seawater and distilled as diluent

3.2 Test and control assays

The control assays were evaluated only after 96h. The highest biomass productions were obtained in the positive controls (PC-SW, PC-DW) and in the test assays (TA-SW, TA-DW), in this order. The substrate change of diesel oil (toxic) to corn oil (nontoxic) in the positive control obviously favored the increase of biomass production in comparison with the test assay. In these same test and control assays, the biomass concentrations in seawater were greater than the biomass concentrations in distilled water, highlighting the importance of the natural mineral salts dissolved in seawater for oil diesel biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988, besides the seawater supplementation with nitrogen and phosphorus salts. The comparison of the test and negative control assays allows one to observe that the addition of ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate in the TA-SW and TA-DW favored the biomass production in both assays. On the other hand, the substrate change of diesel oil to kerosene disfavored the increase of biomass production in the kerosene controls (KC-SW and KC-DW), since kerosene is potentially more toxic than diesel. In all experiments, the surface tensions in seawater-based media were greater than the surface tensions in distilled-water-based media revealing an inverse relation between the increase of the salinity and the surface tension reduction.

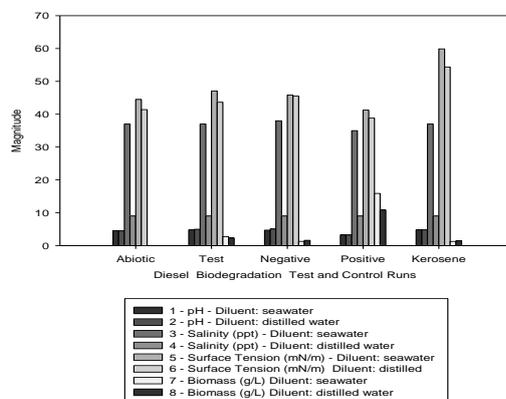


Fig. 2 Test and control assays in diesel biodegradation using seawater and distilled water as diluent

3.3 Modelling

A three-phase (linear ascendant, linear descendent and exponential) model and a four-phase (exponential, linear descendent, exponential and linear descendent) model were developed to simulate the growth biomass kinetic profiles in TA-SW and TA-DW. Table 1 shows the models and kinetics parameters obtained from the mathematical fitting. Both growth models for diesel oil biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988 are based on Monod kinetics (1949). Specific growth rates (k) were determined during the exponential phases and doubling times (t_d) were calculated by incorporating the specific growth rates. In the TA-SW, the specific growth rate was two times lower than in the TA-DW, revealing the strong inhibitor effect of the salinity on growth rate of oil diesel-degrading microorganisms. Regression analyses were performed using the softwares: Statistica Version 8.0 (Statsoft Inc., USA) and Sigma Plot version 11 (Systat Soft.Inc., Germany).

Table 1. Comparison of kinetic models and parameters for growth of *Candida lipolytica* UCP 0988 in diesel oil biodegradation processes using as diluent seawater and distilled water

Growth Phase	Seawater				Distilled water			
	Biomass model	R^2	k (h^{-1})	t_d (h^{-1})	Biomass Model	R^2	k (h^{-1})	t_d (h^{-1})
Linear Ascendant	$m=0.445t+0.42$	1.000	-	-	-	-	-	-
Exponential	-	-	-	-	$m=0.6308e^{0.1741t}$	0.864	0.174	3.981
Linear Descendant	$m=-0.34t+3.56$	1.000	-	-	$m=-0.1175t+3.92$	1.000	-	-
Exponential	$m=0.7437e^{0.013t}$	0.985	0.013	51.913	$m=0.6318e^{0.026t}$	0.963	0.026	26.613
Linear Descendant	-	-	-	-	$m=-0.0642t+8.46$	1.000	-	-

R^2 – Determination coefficient

k - Specific growth rate

t_d - doubling time

m -biomass (g/L)

t – time (h)

3.4 Effects of salinity

The time courses of salinity, pH, surface tension and biomass production in the TA-SW and TA-DW are presented in Fig. 3 (a-e). In the TA-SW - during the linear ascendant phase (Fig.1 and Fig.3c) - the yeasts use preferentially to grow, the biodiesel, nontoxic carbon source, and salts nutrients. Then, the biomass production increase and the salinity, pH and ST decrease. In the linear descendent phase, the salinity, pH and ST continue to decrease and only the cells more adapted to the saline, acid, surface and toxic (diesel oil) stresses survive. In the exponential phase, between 8 and 96h, diesel oil assimilation occurs, associated to exponential biomass production. The pH (Fig.3a) and the ST (Fig.3b) initially decrease - reaching minimal values around 20 h, and afterwards increase, reaching peak values around 48 and 72 h, respectively. The salinity decreases until approximately 35 h and then increases until reaching a peak value at 72h. After 72 h, the pH increases and the salinity and ST decrease until 96h (Fig.3a-c). The maximum biomass production (2.72 g/L) was reached with 96h, salinity of 37‰, pH 4.78 and ST equal to 47.07 mN/m. The kinetic profiles of salinity, pH, ST and biomass production, in the TA-DW, are sufficiently different from those of the TA-SW, to allow evaluation of the effect of the absence of the mineral salts present in sea water on the biomass production in the oil diesel biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988.

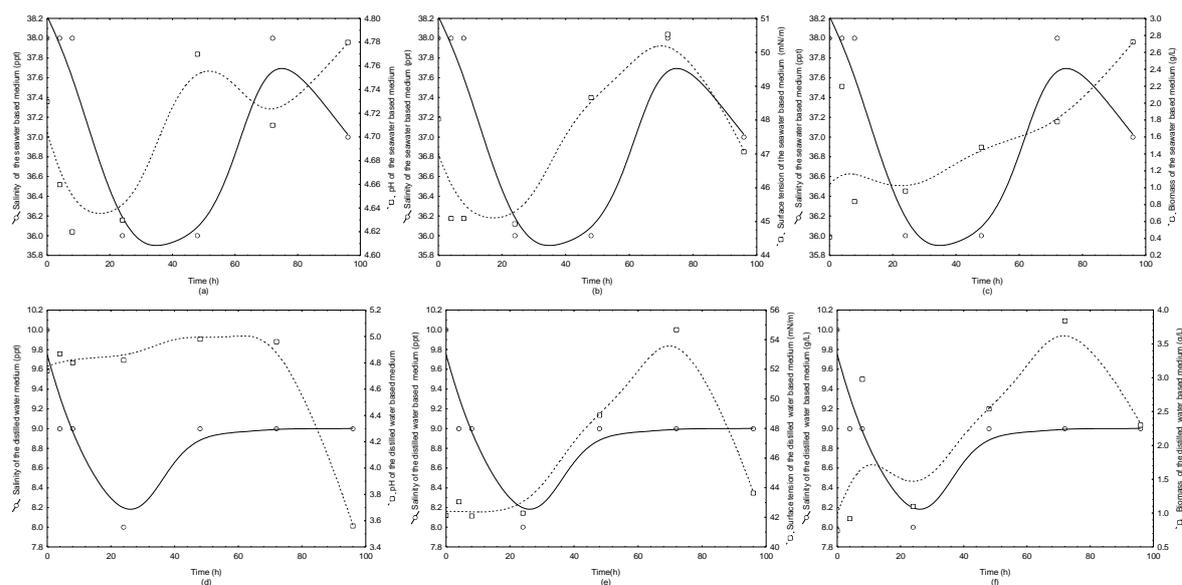


Fig. 3 Effects of salinity on pH (a and d), surface tension (b and e) and biomass concentration (c and f) in seawater and distilled water based media.

In the TA-DW, during the early exponential and linear decline phases (Fig.3f), the yeasts use initially the biodiesel and salts nutrients to survive, while the pH increases slowly (Fig.3d), the ST practically remains constant (Fig.3e) and the salinity decreases until it reaches a minimal value after around 24h (Fig.3f). In the late exponential phase, the pH increases slowly until 72 h, presenting slight variation associated to the biomass production (Fig. 3d). The ST also increases associated to the biomass production until 72h (Fig.3e), when both reach peak values and afterwards decrease continuously until 96h. The salinity increases associated to the biomass production (Fig. 3f) and the surface tension (Fig.3e) until 48 h, and then remains practically constant, varying around 9‰ until 96h, favoring the biomass production (Fig.3e) and inhibiting the biosurfactant production by the increase of its consume (Fig.3e) and by the production of organic acids (Fig.3d), between 48 and 72 h. The decline of the biomass production (Fig.3f), between 72 and 96h, is probably associated with the death of the yeasts, due the limitation of carbon source and salts nutrients, the reduction of the pH (acid production) and the reduction of the ST (biosurfactant production). The maximum biomass production (2.3 g/L) was reached with 96h, salinity of 9‰, pH 3.56 and ST equal to 43.65 mN/m. In the process described above, the ST reduction is related to biosurfactant production, accessibility and biodegradation, while the ST elevation is related with the utilization of the biosurfactants produced by yeasts. Various research studies corroborate with the above results [10-11]. Salinity has a great impact on diesel oil biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988. The results suggests that high salinity (greater than 35‰) constitutes a natural barrier to the oil diesel biodegradation, but that the halotolerant yeast *C. lipolytica* UCP 0988 presents the ability to grows on diesel oil and enhance its biodegradation, in both environments, TA-SW and TA-DW.

5. Conclusion

The high salinity exerts a strong inhibitory effect on the cell growth and on the hydrocarbon biodegradation of diesel oil. The doubling time in the TA-SW is approximately twice slower than in the TA-DW. However, the extent of the late exponential phase and of the diesel oil biodegradation process in the TA-SW is greater than in the TA-DW. Being facultative marine yeast, *C. lipolytica* UCP 0988 adapts its biological systems and gives effective defence responses to salt stress. The physiological changes and the products (biosurfactants/bioemulsifiers among others) synthesized to maintain cell growth and survival in hypersaline aquatic environment (salinity higher than 35‰) contaminated with diesel oil, favour the cell growth and the uptake and biodegradation of diesel hydrocarbons by *C. lipolytica* UCP 0998, in the conditions investigated.

Acknowledgements: This work was financially supported by the *FACEPE, CNPq, CAPES* and *UNICAP*.

References

- [1] Mille G, Ahmal'lah M, Bianchi M, Van Wanbeke F, Bertrand JC. Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1991, 339:788-791.
- [2] Bertrand J-C, Bianchi M, Mallah MA, Acquaviva M, Mille G. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1993;168: 125-138.
- [3] Thavasi R; Jayalakshmi S; Balasubramanian T; Banat I. Effect of salinity, temperature, pH and crude oil concentration on biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. 2007;1:51-57.
- [4] Gagneaux-Moreaux S, Moreaux C, González J, Cosson P. Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia* and other marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 2007; 19:549-556.
- [5] Zhou QH, Kosaric N. Utilization of canola and lactose to produce extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters*. 1995; 15: 477-482.
- [6] Singh P, Cameotra S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22: 142-146.
- [7] Mariano AP, Tomassela RC, Oliveira LM, Contiero J, de Angelis DF. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7:1323-1328.
- [8] Monod, J. The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology*. 1949; 3:371-394.
- [9] Solopova, A, van Gestel J, Weissing F, Bachmann H, Teusink B, Kok J. Bet-holding during bacterial diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111:7427-7432.
- [10] Desai JD, Banat I M (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997; 61: 47-64.
- [11] Moliterni E, Gómez R, Rodríguez L, Fernández, FJ Villaseñor J. Biosurfactants production during diesel biodegradation by mixed microbial consortia selected from polluted spools. *International Journal of Environmental Research*, 2012; 6:751-760.

Anexo III: Normas para escrita e submissão do manuscrito – Capítulo de livro (Biomicroworld)

Guidelines for manuscript preparation (maximum length: 5 pages)

A. Méndez Vilas^{*1,2} and J. A. Mesa González¹

¹FORMATEX Research Center, Zurbarán 1, 2-Office 1, 06002 Badajoz, Spain

²Department of Applied Physics, University of Extremadura, Avda. Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain

*Corresponding author: e-mail: conference@biomicroworld2015.org, Phone: +34 924258615

Short guidelines for manuscript preparation are provided below. Please read them carefully before preparing and submitting your manuscript to the proceedings of the VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015. Manuscripts must be formatted according to this template (do not alter the margins or page size). Each manuscript requires an abstract (maximum length: ten lines).

Keywords keyword; keyword

1. General remarks

Manuscripts should be written in correct English. Please consult a native speaker or a knowledgeable colleague for help, if necessary.

Please follow our short instructions for authors given in the *Call for Papers* section on the conference website www.biomicroworld2015.org. Please submit your manuscript exclusively as **one single document** including the entire text as well as all tables and figures. **Please note that papers must be restricted to a total of five printed pages using this template including figures/tables and references.** Large numbers of figures should be avoided. The page size of this template is A4 (please, do not alter it). Use **“Times New Roman” font throughout the text.**

2. Title information

The manuscript should begin with the title of the paper in lower case letters except for proper nouns, certain abbreviations, physical quantities etc. It is followed by the names of all authors (with first name initials or full names) and the corresponding institutions (from the smallest to the largest unit, e.g. group, department, and university) with addresses, as given in the above example (street or P.O. box, city with zip codes, country). Countries should be written in English.

Please identify the corresponding author unambiguously and add his/her electronic mail address and, optionally, phone and fax numbers. A corresponding address valid for the entire period from submission until publication of the paper must be given either in the manuscript or in an accompanying cover letter. This is especially important in cases where the current address deviates from the author's affiliation in the paper.

Keywords *must* be provided separated by semicolon.

3. Manuscript layout

3.1 File formats and templates

Please prepare your manuscript electronically using Microsoft Word (or compatible formats like RTF). All textual material of the paper (including tables, captions, etc.) should be in a single file. It is essential that you use the provided template. Do not alter the margins or page size. Please use the predefined styles for title, authors, abstract, body etc). Please use “Times New Roman” font throughout the text. Section headings on all (preferably not more than three levels) should be consecutively numbered by decimal numbers as 1, 1.1, 1.1.1 etc.

3.2 Figures and tables

Figures must be carefully prepared and submitted ready for reproduction. Lettering and symbols should be clear and large enough in the final figure size (the typical width of a figure in the proceedings is about 7 cm; smallest letters should not be smaller than 1.5 mm). Avoid small open symbols, small dots, small decimal points, and hairlines, close-dotted or short-dashed lines. Draw a closed axes frame in diagrams with the axis titles (quantity followed by the unit in brackets) parallel to the corresponding axis, outside the frame. For numbers, use a decimal point instead of a comma. For symbols and units, avoid writing alpha, Ohm, deg; use Greek and special characters instead: α , Ω , $^\circ$.

Table 1 BioMicroWorld2015. Tables will appear left-aligned (with a 0,5cm left indent) or center-aligned, unless it is very wide and requires the whole page width.

Year	Random data	Random data
2012	6623	1435
2013	2445	8027
2014	5210	3600



Fig. 1 *BioMicroWorld2015* venue. Figures will usually appear left-aligned (with a 0,5cm left indent) or center-aligned.

Figures and tables including captions should be embedded in the manuscript file, in order to indicate their appropriate position and required space. Figures and tables will appear left-aligned (with a 0,5cm left indent) or center-aligned. Other possible arrangements are shown in this document (Figs. 1–3, see also Table 1). When composing a figure, avoid using separate drawing elements in Word such as arrows, symbols or letters, since these are often lost if a figure must be extracted from the Word file during typesetting. All elements of a figure should be grouped together as one graphics object.

Half-tone figures should have 300 dpi, line drawings 1200 dpi minimum resolution in final size. Screen or web resolution, e.g. JPG-compressed format, is usually insufficient for publication.

In the text, the figures or tables are referred to as “... in Fig. /Table 1” or as “Figure/Table 1 shows ...” at the beginning of a sentence.

The book will be printed in black and white.

3.3 Quantities, units, and equations

All physical quantities and constants should be given in *italic*, vectors in ***bold italic*** letters (both in the text and in equations). Care should be taken to distinguish subscripts, superscripts, and special symbols. Units should be written in upright letters (not in italics) with a short space to the number before. SI units should be used throughout. Mathematical functions which are tabulated (e.g. sin, cos, exp, e, etc.) should be given in upright letters (not in italics).

Equations may be numbered sequentially. Except for small in-line equations, they should appear on separate lines, such as

$$f(x) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{n\pi x}{L} + b_n \sin \frac{n\pi x}{L} \right) \quad (1)$$

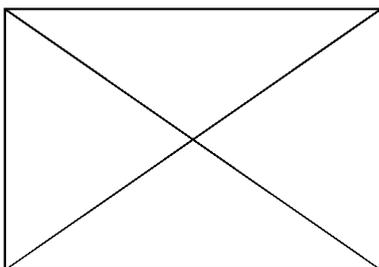


Fig. 2 Figure with side caption. This option is particularly appropriate for a single illustration with a maximum width of about 8 cm which cannot be grouped together with another figure. The figure is placed left-aligned with no indentation. The caption text must not exceed the available space beside the figure. Depending on the position of the figure at the top or the bottom of the page, the caption is also aligned top or bottom, respectively.

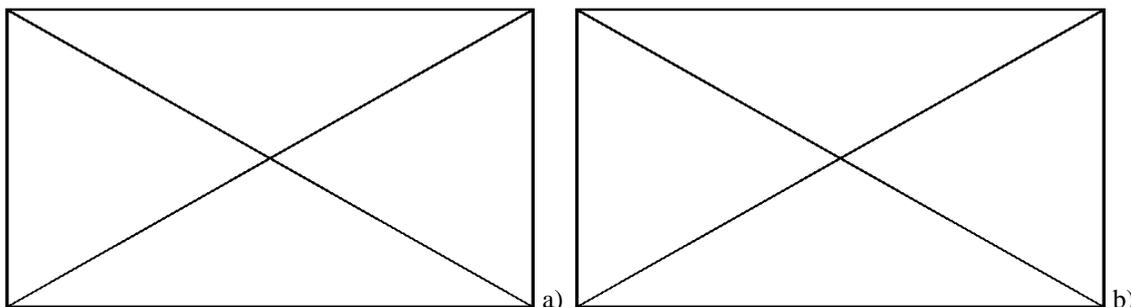


Fig. 3 Two parts of a figure side-by-side. They should be labelled a) and b) either in the figure or adjacent to it. Such figures are not left indented. Two figures of similar size with consecutive numbers may be arranged in the same way, with separate captions underneath each figure.

In the text, equations may be referred to by writing "... in Eq. (1)". At the beginning of a sentence, use the full form "Equation (1) shows ...".

3.4 Formatting of references

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in square brackets.

References should follow the standards summarized in the NLM's webpage [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References](#).

Some examples about citation of journal articles, books and websites are shown below.

Acknowledgements The support is gratefully acknowledged.

References

- [1] Hess ST, Girirajan TP, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*. 2006; 91:4258-72.
- [2] Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
- [3] Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
- [4] Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. *Germ cell tumours V*. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer; 2002.
- ...
- [10] Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2012 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Anexo IV: Notificação de Aceite do artigo I para publicação

De: "BioMicroWorld2015 Conference" <conference@biomicroworld2015.org>

Para: cdaisy@unicap.br

Enviadas: Quarta-feira, 3 de fevereiro de 2016 8:43:26

Assunto: Paper Acceptance Notification

Dear Clarissa Daisy C. Albuquerque,

We are pleased to inform that your paper entitled:

"Effect of salinity on diesel biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988"

related to a work presented during the last VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Barcelona, Spain, 28-30 October 2015), has been accepted for publication in the Proceedings Book, which will be entitled: "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms".

The book will be published and internationally distributed by BrownWalker Press, and it is expected to be released in spring 2016.

Meanwhile, the Publisher requests you to transfer the copyright of your paper. Please read and fill in the copyright form attached to this email. For jointly authored material, all joint contributors should sign, or one of the contributors should sign as authorized agent for the others.

Once filled in, please send back the form to the email conference@biomicroworld2015.org or the fax number: [+34 924 263053](tel:+34924263053) no later than 12 February 2016.

As soon as the book is released, you will be informed about all the necessary details for full citation of your paper. (Please find attached the camera-ready copy of your paper)

Thank you very much for your contribution to the book.

Best regards,

Aurora Solano

BioMicroWorld2015 Conference

Phone: [+34 924 25 86 15](tel:+34924258615)

Fax: [+34 924 26 30 53](tel:+34924263053)

e-mail: conference@biomicroworld2015.org

<http://www.biomicroworld2015.org>

ANEXO V: Artigo II na versão da Revista Marine Pollution Bulletin

Scale up of Candida lipolytica UCP 0988 biofilm-mediated diesel biodegradation in seawater

Hamilton Felix Nobrega

Fabiane Seger

Maria Andreza Bezerra Correia

Maria Luisa Oliveia Mergulhão Freitas Henriques

Galba Maria Campos-Takaki

and Clarissa Daisy da Costa Albuquerque*

Post-Graduate Program in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE, Brazil
Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50.050–590, Recife, PE, Brazil

*Corresponding author: Tel.:+55 (81) 21194015 Fax: +55 (81) 21194020.
E-mail: cdaisy@unicap.br

Abstract

Scale up experiments were conducted in 2.8-L Fernbach flasks and 5-L bench bioreactor to study the diesel oil biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988 in sea water supplemented with ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate. The yeast showed potential to utilize diesel oil as sole carbon source and energy, being able of utilizing n-alkanes, branched alkanes and aromatic compounds, with a preference for alkanes with intermediate carbon chain lengths. The percentage of diesel biodegradation was

determined using gravimetric method and gas chromatography/mass spectrometry of the residual diesel oil after 9 days. Biofilm formation contributed to increase the degradation efficiency of the hydrocarbon compounds. Aeration and agitation influenced the growth as well as hydrocarbon biodegradation. The two-stage *scale up* strategy adopted in present work was effective and might facilitate further *scale up* for larger scales.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, hydrocarbons, petroleum, bioremediation, biosurfactant, biofilm.

1. Introduction

The potential for yeasts to metabolize hydrocarbons is well established (Cerniglia and Crow, 1981). Marine yeasts are reported to be truly versatile agents of biodegradation. They participate in a range of ecologically significant processes in the sea, especially in estuarine and near-shore environments (Kutty, Philip, 2008).

Recent research showed that marine yeasts have several unique and promising features over the terrestrial yeasts, for example higher osmosis tolerance, higher special chemical productivity and production of industrial enzymes. However, only little attention has been given to marine yeasts (Zaky et. al, 2014).

Although marine yeasts are still not widely applied, on an industrial scale, in ex-situ bioremediation processes of seas and oceans contaminated with petroleum and its derivatives, researches of *scale up* strategies for hydrocarbon biodegradation processes by yeast from marine ecosystems could lead to development of environmentally friendly, cost-effective and innovative marine bioremediation technologies and high value-added bioproducts, such as enzymes, bioemulsifiers and biosurfactants.

In situ bioremediation of sea and ocean waters contaminated by petroleum and petroleum products as diesel oil is, until now, a great challenge, due to the difficulties to assess and control the critical factors involved, specially the environmental. When it can be carried out safely, it is much less expensive and causes less environmental perturbation than physical cleanup methods and *ex situ* bioremediation. When it cannot be carried out, the *ex-situ* bioremediation is an effective and environmental friendly alternative technology to be considered. In general, the implementation of *ex-situ* bioremediation is associated to batch or fed batch hydrocarbon biodegradation processes, started and optimized in laboratory scale and after transferred for pilot and/or industrial scale.

The traditional method for scaling-up a fermentation system is usually based on empirical criteria, such as constant power input per unit volume, constant mass transfer coefficient, constant mixing time and constant impeller tip velocity (Shuler et al., 1992). However, the supracited empirical criteria present shortcomings, especially due a changes in the controlling regime during the *scale up* (Charles, 1985).

Therefore, in present work is proposed a two stage *scale up* strategy for diesel oil biodegradation in seawater by *Candida .lipolytica* UCP 0988 – following the same fundamentals used in the approach for scaling-up fermentation system introduced by Hsu and Wu (2002), based on the evaluation of the effects of the environmental state variables on the biodegradation and of the variation of the environmental state variables.

During the last decades, similar approaches have been used in *scale up* of hydrocarbon biodegradation processes among flask and/or bench bioreactor and/or pilot and/or industrial scales (Gomes et. al, 2010, Pereira Silva et. al, 2012; Usharani e Muthukuma, 2013; Sharma et. al, 2014; Moscovo et al 2015). In this work *scale up* was conducted in 2.8-L Fernbach flasks and 5-L bench bioreactor aiming to study , among

others, the effects of agitation, aeration and inoculum concentration on diesel oil degradation process by *Candida lipolytica* UCP 0988 in sea water.

Materials and Methods

2.1. Microorganism and maintenance medium

The yeast *C. lipolytica* UCP 0988 was obtained from the UCP (Universidade Católica de Pernambuco) Culture Collection, housed at the Center for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Recife Pernambuco, Brazil and registered in the World Data Center for Microorganism (WDCM) of the World Federation for Culture Collection (WFCC) under the number WDCM 927. The yeast was maintained at 4 ° C in agar YMA with the following composition: yeast extract 3 g / L, malt extract 3 g / L, glucose 10 g / L tryptone, 5 g / L, agar 15 g / L and pH 5.

2.2. Diesel oil

Petrobras diesel oil, B7 metropolitan type (blend diesel/7% biodiesel), maximum of 0.05% sulfur; with additives; contains paraffinic, naphthenic and aromatic hydrocarbons (10 to 40%).

2.3. Sea Water

The seawater was collected in Suape Harbor , Pernambuco, Brazil. Its composition was Ca⁺⁺ 1.00%; Mg⁺⁺ 0.97%; Na⁺ 11.13%, K⁺ 0.88%, Cl⁻20.50%, SO₄⁻⁻ 3.41%. The salinity, specific gravity, pH and surface tension were equal to 37‰; 1026 kg/m³, 8.22 and 53.43 mN/m, respectively.

2.4. Sequential Scale up Strategy for diesel biodegradation

A two stage *scale up* strategy for diesel oil biodegradation by *C.lipolytica* UCP 0988 was adopted. In each stage was used a type of bioreactor and the initial environmental conditions described in Table 1. The bioreactors were partially filled with the mineral media (MM), i.e., seawater supplemented with ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate in according with the volumes and concentrations specified in Table 1. The initial pH of the MM was adjusted to 5.0, after which it was monitored but no controlled. The MM were sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. The sole carbon source was B7 metropolitan diesel, that was sterilized by autoclaving using fluent vapor for 15 min, in previously sterilized glass bottles. Diesel oil was added to the MM at the specified concentrations. The biodegradation process was started by adding of 24 h *C. lipolytica* UCP 0988 inoculum into the bioreactors, without previous acclimation phase. Values of initial biomass concentration (48 h inoculum), aeration, and agitation rate were established according to Table 1. The time period for diesel biodegradation experiments in the first and second stage of *scale up* strategy was established as being equal to 216 h, respectively. The bioreactors were operated in batch mode under uncontrolled pH and dissolved oxygen conditions. For each *scale up* stage, inoculated control flask was prepared to account abiotic volatilization and extraction losses of the diesel. Samples were removed aseptically at 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 192 and 216 h for further analyses. The size of aliquot was 50mL for Fernbach Flask and BioFlo 2000. All treatments and analysis were performed in duplicate.

2.5 Full Factorial Design (FFD) in Fernbach Scale

A 2² full factorial design in duplicate was carried out at Fernbach flask scale to verify the effects and interactions of the initial biomass concentration (inoculum) and agitation rate

on the final biomass concentration, surface tension, emulsification activity and diesel oil biodegradation. The range and levels of the factors (or independent variables) under study are given in Table 2 and were previously optimized and validated (Henriques, 2013; Seger, 2013). Statistical analysis of the factorial design was performed using Statistica® software version 8.0 (Statsoft, Inc., USA) and SigmaPlot version 8.0 (Statsoft, Inc., USA). For the best run of the 2^2 FFD were performed: positive control consisting of sea water, corn oil, nutrients and inoculum (PC-SW); negative control consisting of seawater, diesel oil and inoculum (NC-SW) and the abiotic control consisting of seawater, diesel oil and nutrients (AC-SW). The positive control served as a point of reference for reproducible biodegradation under optimal conditions (non-toxic). The negative control served as a point of reference for reproducible biodegradation under sub-optimal conditions (nutrient limitation). The abiotic control served to measure abiotic losses (ie additional volatilization losses and dissolution).

2.6 Cell mass estimation

The residual oil was extracted from biomass using methanol (CH_3OH) /chloroform (CHCl_3) mixture at a ratio of 10: 1 (Zhou and Kosaric, 1995). Biomass was determined gravimetrically by dry-weight measurement at 80°C for 24h. Suitable calculations were made to express cell mass in terms of g/L.

2.7 Surface Tension

The surface tension of cell-free broth - obtained by centrifuging the cultures at $10000 \times g$ for 15 min- was determined in a Sigma 70 tensiometer (KSVInstrument Ltd- Finland), using

the Du Noy ring method (SINGH and CAMEOTRA, 2004). The values reported are the mean of three measurements.

2.8 Emulsification activity

Emulsification activity was evaluated according to the method described by Cirigliano and Carman (1984). Samples collected during the microorganism growth were filtered through—Milipore® membranes (pore diameter of 0.22µm). Cell free aliquots (2 mL were transferred to test tubes and diluted with 2 mL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3). Then, 1mL of oil (diesel oil, or corn oil or n-hexadecane) was added the mixture was vortexed for 2 minutes at 28°C in shaker tubes. After 10 minutes (at rest), the absorbance was measured. The culture medium was used as blank. One unit of emulsification activity (UEA) was defined as the amount of emulsifier required to produce an emulsion with absorbance equal to one at 540 nm.

2.9 Emulsification index

The 24h-emulsification index (E₂₄) was determined, according to Cooper and Goldberg (1987), by adding 6 mL of a substrate for emulsification (diesel oil, motor oil, n-hexadecane and corn oil) to 4 ml of cell-free broth, mixing with a vortex for 2 min, and leaving to stand for 24 h. The E₂₄ index is given as percentage of height of emulsified layer (mm) divided by total height of the liquid column (mm).

2.10 Determination of salinity and specific gravity

The salinity and the specific gravity of seawater and the cell-free cultures were determined using hand-held refractometer without automatic temperature compensation, with salinity range from 0 to 100‰ and specific gravity range from 1000 to 1070, resolution 0.7%.

2.11 Diesel oil extraction

Sample of 15 mL cell free culture filtrate was extracted with 15 mL of n-hexane (solvent). The n-hexane phase (residual oil) was collected from the flasks, and the extract was dehydrated with 10 g of Na₂SO₄. The extract was then filtered through a glass funnel with Whatman filter paper No. 4. The filtrate was subjected to a further filtration, this time with a 0.22µm Millipore® membrane to eliminate any waste, in order to ensure the purity of the sample for GC-MS analysis. Uninoculated control was prepared to account abiotic volatilization and extraction losses of the diesel. The biodegradation percentage of the Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by *C.lipolytica* UCP 0988 was calculated according to the following equation:

$$TPH(\%) = [(X_c - X_s)/(X_c)]100,$$

where X_c is the diesel oil remaining in the control culture, and X_s is the diesel oil remaining in the sample culture.

2.12 Gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS) analysis of diesel degradation

GC-MS analysis was done for detecting the degradation effect of diesel [Zhenle et al 2006, Palanisamy et al 2014, Hua et al 2013]. Samples removed at the initial and final stages were analysed by GC/MS to determine the quantity and composition of the total of hydrocarbons. The extract was analyzed by a Shimadzu™ gas chromatograph (17A/QP5050A model),

equipped with a VB-5-MS Capillary Standard Non-Polar column (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) and with a split-split less injector (splits ratios of 105:1). The oven temperature was initially at 40°C for 4 min and then programmed to 290°C at a rate of 4°C /min where it was held for 8 min. The temperatures of the injector, transfer line and ionization source were all 290°C. The electron impact ionization was tuned at 70 eV and helium was used as carrier gas with an average linear velocity of 1.0 ml/min. One micro litre of the organic phase (the extracted oil sample) was injected. The injections of samples were carried out using three independent replicates. Analysis was by scan (m/z 35 to 500). Hydrocarbons were identified by retention time behavior in comparison with known samples and by using the NIST library for match mass spectra. Reduction of hydrocarbons was estimated in terms of percentage of reduction in total chromatographic peaks of waste after cycle, compared to the those from the fresh waste added (Gomes 2010). Reduction on diesel oil (most significantly hydrocarbons) was estimated by the means of comparing the peaks of abiotic control to those of the treated samples, and results were reported in terms of percentage of reduction of hydrocarbons.

Results

Identification of the diesel oil biodegradation conditions in bioreactors of small scale is the first step for modeling, simulation, optimization and operation, in pilot and industrial scales, of *ex situ* bioremediation processes of sea and oceans contaminated by petroleum and derivatives. Little information is available regarding the diesel oil biodegradation in seawater by yeasts. Previous laboratory studies (Henriques 2013, Seger 2013) identified the ammonium sulphate and potassium monobasic phosphate concentrations necessary for the

reduction of high concentrations of diesel oil in seawater. The identification of the adequate nutritional conditions led to further development of a two-stage *scale up* strategy, in which the effects of salinity, initial biomass concentration, agitation rate and aeration on the diesel oil biodegradation were investigated. Diesel oil was successfully reduced using the two-stage *scale up* strategy, which is presented below.

3.1 First Stage – Diesel oil biodegradation Studies in Fernbach-scale (2.8 L)

The results of the 2^2 full factorial design carried out at Fernbach scale are presented in Table 3 and show that *C. lipolytica* UCP 0988 had ability to grow in seawater contaminated with diesel oil, supplemented with ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate. Regression analysis and variance analysis (ANOVA) were applied to results presented in Table 3. First order models were fitted to data to evaluate the main effects and interactions of the two factors on the five dependent variables. The models developed to biomass, pH, surface tension and percentage of biodegradation did not exhibit significant lack of fit to the experimental data and could explain more than 90% of the variability in the response (Table 4). The significance of each coefficient of the models were determined by the student *t*-test and *p*-values, which are graphically represented in the Pareto charts illustrated in Figure 1, and allow the analysis of the effects and interactions of the initial biomass and the agitation rate on the biomass (Fig. 1a), pH (Fig. 1b), surface tension (Fig. 1c) and percentage of biodegradation (Fig. 1d) with 216 h. The length of each bar on standardized Pareto chart is proportional to the absolute value of its associated coefficient or estimated effect. The chart includes a vertical line, which corresponds to the 95% confidence limit indicating statistical significance. An effect is therefore significant, if it crosses this vertical line. The models and Pareto charts presented

shows that initial biomass concentration and/or agitation rate are factors that exert significant effects on the Fernbach scale diesel oil biodegradation in seawater by *C. lipolytica* UCP 0988. Analyses of the results illustrated in Figure 1 indicates that: (i) the increase of the agitation rate and of the initial biomass concentration exerted significant positive effects on the increase of final biomass concentration. (ii) the increase of the agitation rate and the interaction between the initial biomass concentration and agitation rate exerted significant negative effects on the increase of the pH; (iii) the increase of the agitation rate, the increase of the initial biomass concentration and the interaction between agitation rate and initial biomass concentration exerted significant positive effects on the increase the surface tension and (iv) the increase of the initial biomass and the increase of agitation rate exerted a significant positive effect on the increase the TPH biodegradation percentage, while by other side the interaction between the initial biomass concentration and the agitation rate exerted a significant negative effect on the increase the TPH biodegradation percentage. This can be explained simply: when larger the agitation rate faster oxygen consumption rates will result; when larger yeast population are initially present in the inoculum faster diesel oil consumption rates will result. In Fernbach flask scale, the best condition for diesel oil biodegradation of the 2^2 FFD (Table 2) was those used in run 4 and in its replicate (run 8): initial biomass concentration equal to 0.636g/L and agitation rate equal to 200 rpm. These conditions were considered as the most favourable to the diesel biodegradation, because produced: (i) the highest biomass, (ii) the lowest pH, (iii) highest emulsification activity values for diesel oil- 216h cell free broth and corn oil - 216h cell free broth emulsions and (iv) the 216h TPH biodegradation average value without significant statistical difference in relation to the run 2, that presented the highest value of FFD. The time courses of the best assay of the 2^2 FFD and of the

correspondent negative, positive and abiotic controls, which were carried out at the same conditions but in a shorter period of time, are presented in Fig.2. The growth profile showed correlation with the extent of diesel biodegradation. Maximum biomass production (7.86 g/L) was obtained in negative control with 48h, suggesting the preference of *C. lipolytica* UCP 0988 by media with salinity near to natural seawater. After this time, the biomass production in negative control decreased continuously, due to limitations of nitrogen and phosphorus sources in seawater. By other side, in the test experiment (experiment in the same conditions of best assay the 2² FFD), the biomass production attained 4.02 g/L with 48h and continued increasing until to attain approximately 5.0g/L in the end of the process. The supplementation of the seawater with ammonium sulfate and potassium phosphate, in the test experiment, favored the extension of diesel oil biodegradation process. Addition of these nutrients has also reported to enhance hydrocarbon biodegradation (Atlas and Bartha, 1993, Prince, 1993, Souza, 2012). The pH and the surface tension of the test experiment and of the negative and positive controls decreased continuously, suggesting organic acid and biosurfactant productions during the biodegradation process. According Coelho et al (2010), *Yarrowia lipolytica* presents the ability to produce and secrete a great variety of organic acids, including TCA cycle intermediates. The carbon sources used in these processes can be, among others, n-alkanes in growth limited conditions caused by different nutrition factors, like nitrogen source, thiamine, phosphate or mineral compounds (phosphorous, magnesium, sulphur). Hassanshahian et al. (2012) isolated and characterized two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf, that had high cell surface hydrophobicity and could dramatically reduce the surface tension. In addition, these strains had the sufficient level for emulsification activity based on hydrocarbon substrates. The percentage degradation

of the hydrocarbons in diesel oil was calculated by comparing the chromatographic peaks of abiotic control with those from the 2² FFD best run. The biodegradation of diesel was confirmed by the reduction in the area under hydrocarbon peaks of the chromatograms, when compared to that of the abiotic control (without organism), suggesting that the removal of diesel hydrocarbon components ranged from 7 to 13 carbon atoms. Degradation of n-alkanes, branched alkanes and branched alkenes by *C. lipolytica* UCP 0988, at 0 e 216h, is illustrated in Figure 3. Only aliphatic hydrocarbons, identified by mass spectrometric analysis, that attained percentage degradation higher than 85%, considering the abiotic losses, are represented. The pattern of degradation showed that the yeast *C. lipolytica* UCP 0988 preferentially attacked nonane and latter middle length branched alkanes chains. There were also significant amount of biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988 for others alkanes and utilization of components from aromatic fraction, these last were more resistant to biodegradation than aliphatic compounds. Many these compounds, especially linear alkanes, are known to be easily biodegradable (Marquez et. al, 2001). Work developed by Miranda et al (2007) ratify the preference of the diesel oil degrading yeasts by alkanes. The yeast *R. aurantiaca* UFPEDA 845 showed higher percentages of degradation for decane, nonane and dodecane (93.0%, 38.4%, and 22.9%, respectively) while *C. ernobii* UFPEDA 862 completely degraded tetradecane, 5-methyl-octane and octadecane, and partially decane (60.8%) and nonane (21.4%). Similar results were also obtained in others diesel oil biodegradation processes by mixed microbial consortium, consisting of bacteria and yeasts, in which the nonane and decane hydrocarbons were the ones most degraded, but others n-alkanes (undecane, dodecane, tridecane, tetradecane, pentadecane, hexadecane, heptadecane, octadecane, nonadecane, icosane, and heneicosane) also showed high degradation percentages (Pereira Silva et. al, 2015). Although it is generally true that

branched alkanes are more recalcitrant than their equivalent straight-chain, studies have demonstrated that many of these branched compounds were more degradable than they have previously been reported (Geerdink et. al, 1996). Results obtained by Gomes et al.(2009) showed this occurrence by autochthonous culture.

3.2 Second Stage - Diesel oil biodegradation in BioFlo 2000 bioreactor (5 L)

Effective *scale up* is essential for successful of diesel oil biodegradation process by *C. lipolytica* UCP 0988 in sea water, therefore in the *scale up* to 5L bench bioreactor scale were kept as many environmental parameters constant as possible. Hence, the initial concentrations of biomass, diesel, ammonium sulphate and potassium phosphate - (Table 1) used in the run 4 (Table 2) of the 2² FFD carried out in Fernbach scale - considered the most favourable to biodegradation- were kept and only the agitation and aeration rates were increased (Table 1).

It is well established in the literature the potential to yeasts to metabolize hydrocarbons compounds, inclusive in marine environmental (Macgillivray; Shiaris, 1993; ZINJARDE et. al, 1997; Hassashanian et. al, 2012). Fig. 4 shows the time courses of biomass production, during 216h, in diesel oil biodegradation processes by *C. lipolytica* UCP 0988, carried out in 2.8 L Fernbach scale and 5L bioreactor scale. In both scales, *C.lipolytica* UCP 0988 exhibited diauxic growth, without earlier lag phase, and was able to degrade MM containing 10% of B7 diesel oil. These results suggest that biodiesel has a substrate priority of utilization by *C. lipolytica* UCP 0988 than diesel oil. Previous works have demonstrated that biodiesel and the biodiesel/diesel blends are more easily and faster biodegraded than diesel oil (Mariano et. al, 200; Bucker et. al, 2011). Similar diauxic behavior was exhibited

by yeast *Rhodotorula aurantiaca* growth in Bushnell–Hass mineral medium, containing 2–12% of diesel, for a period of 20 days (Miranda et al.,2007).

Biofilm formations were observed during the diesel oil degradation by *C. lipolytica* in submerge cultive, in the two scales. Briefly, the yeast grown on glass surface of the Fernbach and bench bioreactor head space, in presence of 10% B7 diesel oil in seawater supplemented with ammonium sulfate and potassium phosphate, with initial pH 5. The formation of biofilms were clearly visible to the naked eye during the *scale up* (Fig 5).

This finding suggest that surface attached *C.lipolytica* UCP 0988 uses the nutrients in the conditioning film and seawater to grow and produce extracellular polysaccharides (EPS) resulting in the formation of microcolonies, that form a layer covering the glass surface of the Fernbach and bench bioreactor headspaces and the stainless steel cover of the bench bioreactor. The biofilm formed in presence of nonvolatile, semi volatile and volatile diesel oil hydrocarbons, accumulate biomass with great thickness, and eventually suffer surface detachment and (re)inoculated the submerge cultivation with cells more adapted to the environmental chemical toxicity, enhancing the diesel oil hydrocarbon total biodegradation. Further and more detailed research focused on the biofilm formation, matrix composition, interactions, biofilm activity and biofilm specific genetic expression patterns, among others important properties and mechanisms, already have been initiated and will be published later. Reports on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biofilm-forming yeasts are still limited in literature. Application of *Candida tropicalis* biofilm towards remediation of diesel oil was investigated by Das e Chandran (2011). The yeast biofilm formed on gravels showed 97% degradation of diesel oil over a period of 10 days. According to the authors, since the ‘artificially’ formed yeast biofilms could efficiently degrade the diesel oil under laboratory condition, they can also play an important role in the bioremediation of liquid

wastes containing hydrocarbons. Cong et al (2014) investigated the biofilm formation by a mixture of yeasts isolated in Vietnam to degrade aromatic hydrocarbon polluted wastewater collected from petroleum storage. The biofilm formed by a mixture of these organisms degraded 90, 85, 82 and 67% of phenol, naphthalene, anthracene and pyrene. Respectively, after a 7-day incubation period using an initial concentration of 600 ppm phenol and 200 ppm of each of the other compounds. Results obtained indicate that the biofilm formed by multiple yeast strains (*Candida viswanathii* TH1, *Candida tropicalis* TH4 and *Trichosporon asahii* B1) may considerably increase the degradation efficiency of aromatic hydrocarbon compounds and may lead to a new approach for eliminating petroleum oil-contaminated water in Vietnam.

Chromatographic profiles of 10% (v/v) B7 diesel oil samples, incubated without and with *C.lipolytica* UCP0988, obtained at 0 h and 216 h, are showed in Fig.6 (a-d) and allowed the comparison of the intensity of the peaks of the control and test samples analyzed. The resolvable hydrocarbons appear as peaks, and the unresolvable hydrocarbons appear as the area between the lower baseline and the curve defining the base of resolvable peaks. The sharp and highest peaks stand for the n-alkanes and the peaks between them comprise the aromatics (including naphthalenes and alkylbenzenes). The abundance of the highest peak was assigned the value 100, and the heights of the others peaks were compared with the highest peak to give the relative abundance assay. The results show reductions in the intensity of hydrocarbon peaks of the abiotic control samples when compared to the biotic test samples.

The GC/MS analysis detected the following best resolvable peaks in sample:

(a) 0 h abiotic control: Heptane, 2,6-dimethyl; Nonane; Decane; Undecane; Tetradecane; Pentadecane; Heptadecane; Heptadecane; Eicosane; Hexadecanoic acid, methyl ester; Heptadecane, 9-hexyl; Eicosane, 2-methyl-; trans-13-Octadecenoic acid; Heptadecane,

2,6,10,15-tetramethyl; Nonadecane, 2-methyl; Eicosane, 10-methyl; Eicosane, 10-methyl; Heptadecane, 9-hexyl; Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)- (Fig 6a).

(b) 216 h abiotic control : Cyclohexane, 1,2-dimethyl-, cis; Heptane, 2,6-dimethyl; Heptane, 2,6-dimethyl; Nonane; Decane; Undecane; Tridecane; Pentadecane; Heptadecane; Eicosane; Eicosane; Hexadecanoic acid, methyl ester; Eicosane; 11-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-; Nonadecane, 2-methyl; Eicosane, 10-methyl ; Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl); Heptadecane, 9-octyl; Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl) (Fig.6b).

(c) 0 h biotic test: 1-Undecyn-4-ol; Octane (C₁₁H₂₀O), 2,4,6-trimethyl- (C₁₁H₂₄); Decane (C₁₀H₂₂); Undecane (C₁₁H₂₄); Decane, 2,4,6-trimethyl (C₁₃H₂₈); Decane, 2-methyl- (C₁₁H₂₄); Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- (C₁₇H₃₆); Heptadecane, 2,6-dimethyl- (C₁₉H₄₀); Tetradecane, 2,6,10-trimethyl (C₁₇H₃₆); Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- (C₁₇H₃₆); Cyclopropanepentanoic acid, 2-undecyl-, methyl ester, trans- (C₂₀H₃₈O₂); 1-Iodo-2-methylundecane (C₁₂H₂₅I).

(d) 216h biotic test: (Replicate 1) Octane (C₈H₁₈); Acetic acid, butyl ester (C₆H₁₂O₂); 10-Chlorotricyclo[4.2.2.0(1,5)]dec-7-ene (C₁₀H₃Cl); Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- (C₁₇H₃₆); (Replicate 2) Hexane, 2,4-dimethyl- (C₈H₁₈); Acetic acid, butyl ester (C₆H₁₂O₂); Spiro[2.4]heptane, 1-ethenyl-5-(1-propenylidene) (C₁₂H₁₆); 1-Iodo-2-methylundecane (C₁₂H₂₅I); (Replicate 3) Octane (C₈H₁₈); Acetic acid, butyl ester (C₆H₁₂O₂); o-xylene (C₈H₁₀); 1-Iodo-2-methylundecane (C₁₂H₂₅I); (Replicate 4) Octane (C₈H₁₈); Acetic acid, butyl ester (C₆H₁₂O₂); Benzene, 1,3-dimethyl- ((C₈H₁₀); 4-Ethyl-1-hexyn-3-ol (C₈H₁₄O); Dodecane, 2,6,11-trimethyl (C₁₅H₃₂).

The yeast *C. lipolytica* UCP0988 showed ability to utilize both aliphatic and aromatic hydrocarbons of diesel oil. After 9 days, the number of hydrocarbon peaks was reduced from 12 (Fig. 6 c) to 4 (Fig. 6d), with almost total degradation of branched and unbranched alkanes within the range from 11 to 20 carbon atoms. However, some aliphatic hydrocarbons with 8, 10, 12, 15 and 17 carbons atoms and aromatic compounds as xylene were resistant a biodegradation in the conditions studied. The toxicity of these hydrocarbons to cell membranes, the inability of yeast to produce enzymes to degrade these recalcitrant compounds and/or the conversion of intermediate compounds into a more complex compounds are among the more probable explications to these results.

The reductions in the intensities and number of the hydrocarbon peaks obtained in the biotic test samples in relation to abiotic control samples were statistically significant (test t, p>0.05). In comparison with 0h biotic test sample (Fig. 6c), the total resolvable

hydrocarbons and unresolvable complex mixture fractions are respectively, smaller and bigger in the 216 h biotic test sample (Fig 6d), which is another indicative of biodegradation. This finding is in agreement with observations made by Mariano et al (2008) in correlated work about biodegradability of commercial and weathered diesel oil. Four replicates of the 216 h biotic test sample were carried out and the chromatographic results obtained were confirmed.

Aromatic hydrocarbon are known to be resistant to biodegradation than aliphatic compounds and are frequently a serious problem during bioremediation process. Gargouri et al. (2015) isolated and characterized hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial waste water that also shown preferential degradation of alkanes to aromatics. The authors related that the yeast strain *Candida* species HC1 was capable of degrading a mixture of low and high molecular weight of aromatic hydrocarbon and a degradation efficiency was observed with anthracene (51%) and fluoranthene (74%) at the end of 7 days. The interest by diesel oil degrading yeasts have increased due to good scientific and biotechnological results reported in literature. Chandran and Das (2011) reported that free cells of *C.Tropicalis* able to degrade 80% of the diesel oil over a period of one week. Palanisamy et al (2014) showed that *A. baumannii* was capable to degrade more than 99% of the diesel oil within 5 days of incubation at initial pH 5 and 28° C. The previous study achieved degradation of 95.01 % diesel by *Trichosporon asahii*. In present study, in the 216h diesel oil biodegradation process by *C.lipolytica* in seawater simulated in 2.8L Fernbach scale, a total of 7 aliphatic hydrocarbons - identified by mass spectrometric analysis like: Heptane, 2,3,4-trimethyl- (7C_br); Octane, 2-methyl- (8C_br); Nonane; Decane, 2-methyl- (10C_br); Undecane, 4-methyl (11C_br); Dodecane, 2,7,10-trimethyl- (12C-br); Tridecane, 3-methylene- (13C=br) - attained percentage degradation

higher than 85%, considering the abiotic losses, after . In the 216h diesel oil biodegradation process by *C.lipolytica* in seawater simulated in 5L bench bioreactor scale, was detected complete degradation (100%) of 6 aliphatic hydrocarbons - identified by mass spectrometric analysis like: 2,4,6-trimethyl- ($C_{11}H_{24}$); Decane; Undecane ; Decane, 2,4,6-trimethyl ; Decane, 2-methyl- and Heptadecane, 2,6-dimethyl-. Partial degradations of others hydrocarbons were also identified. In both scales, aromatics compounds were more resistant to biodegradation than aliphatic compounds.

The results obtained show that the establishment of the aeration rate at 0.875 vvm and the increase of the agitation rate from 250 rpm in Fernbach scale to 300 rpm in the 5L bioreactor scale favoured the diesel oil biodegradation by *C.lipolytica* UCP 0988. This results are in agreement with those described by Amaral et al (2006) and Fontes et al (2010), in which were verified increase of biosurfactant production in higher agitation and aeration rates, due probably to the increase of the mass transfer efficiency of both, oxygen molecules and medium components, considered crucial to cell growth and biosurfactant formation by *Y. lipolytica* IMUFRJ 506682.

In the two stage *scale up* strategy adopted in this work , the yeast *C.lipolytica* UCP 098 using B7 diesel oil as sole source of carbon and energy , synthesized 7.2 g/L of cell mass, after 9 days. Biodegradation of hydrocarbon compounds was detected in Fernbach and bench bioreactor scale. The pH, salinity , surface tension and the emulsification activity for emulsion with n-hexadecane, diesel oil and corn oil were respectively equal to: 3.3; 47%. 38.36 mN/m, 4.416 UEA;4.409 UAE and 4.024 UAE. The results also indicate that initial biomass (inoculum) concentration, nutritional and operational conditions played an important role in the B7 diesel oil biodegradation. Therefore, B7 diesel oil biodegradation by

C.lipolytica UCP 098 in seawater was successfully carried out in the 5L bench bioreactor used in this study.

Conclusion

A two stage *scale up* for the diesel oil biodegradation in seawater by *C.lipolytica* was successfully developed. During the diesel oil biodegradation operational and nutritional no conditions were substantially altered by the scaling-up of the flask scale biodegradation process to bench bioreactor scale. Initial concentration of biomass, agitation and aeration rates are key factors to increase aliphatic and aromatic hydrocarbon biodegradation during *scale up* of diesel oil biodegradation process by *C.lipolytica* in seawater. *C.lipolytica* UCP 0988 has potential to utilize diesel oil as sole carbon source and energy. The components degraded of diesel oil were majorly n-alkanes. Some of the aromatic hydrocarbons were converted into intermediate products. Further investigations are required to establish the effects aromatic compounds. Biofilm formed by *C. lipolytica* UCP 0988 in the two scales investigated may considerably increase the degradation efficiency of hydrocarbon compounds and lead to a new approach for ex-situ bioremediation of seawater contaminated by diesel oil.

Acknowledgement This study was financially supported by Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE).

Table 1—Initial operational and nutritional conditions used in the two-stage scale-up strategy for diesel biodegradation by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater

Bioreactor type	Initial operation and nutritional conditions									
	Volume		pH	Temperature (°C)	Agitation rate (rpm)	Air flow rate (vvm)	Concentration			
	Total (L)	Working (L)					Biomass ¹ (g/L)	Diesel (%v/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ² (g/L)	KH ₂ PO ₄ ² (g/L)
Fernbach	2.8	1.5	5	28	200	0.867	0.636	10	13	2
BioFlo 2000 ³	5.0	4.0	5	28	300	0.875 ⁴	0.636	10	13	2

¹ 48-h inoculum ²Diluent: seawater ³News Brunswick Scientific Co., USA ⁴3.5 L air/min

Table 2—Initial biomass concentrations and agitation rates at different levels of the 2^2 full factorial design

Independent variable	Level	
	-1	1
Initial biomass	0.212	0.636
Agitation rate	150	200

Table 3—Values of independent variables and dependent (response) variables in the 2² full factorial design performed in duplicate

Run	Factor		Response variable								
	Initial biomass (g/L)	Agitation rate (rpm)	21- h Biomass (g/L)	pH	Salinity (ppt)	Specific gravity	Surface tension (mN/m)	Emulsification activity ¹ (UEA)	Emulsification activity ² (UEA)	216-h Diesel (v/v%)	216-h TPHB ³ (%)
	1	0.212	150	4.106	4.08	51	1036	39.84	0.361	0.343	0.119
2	0.636	150	5.397	4.2	53	1038	39.77	0.144	0.455	0.106	29.33
3	0.212	200	5.499	3.15	52	1037	40.00	0.099	1.582	0.114	24.00
4	0.636	200	6.334	2.96	51	1036	46.49	0.398	1.073	0.110	26.67
5	0.212	150	4.493	4.02	51	1036	38.56	0.371	0.396	0.120	20.00
6	0.636	150	5.102	4.11	53	1038	39.55	0.162	0.461	0.109	27.33
7	0.212	200	5.261	3.10	52	1037	39.96	0.984	1.503	0.113	24.67
8	0.636	200	6.232	2.94	51	1036	46.51	0.423	1.096	0.107	28.67

¹ Diesel oil ² Corn oil ³ TPHB = Total petroleum hydrocarbon biodegradation

Table 4—First order models for the 216-h biomass, pH, surface tension, and percentage biodegradation as a function of the 0-h biomass and 0-h agitation rate

Dependent variable (216 h)	First order model	R^2	R^2_{adj}
Biomass	$z = 0.5063 + 2.5814 * x + 0.0221 * y - 0.0023 * x * y$	0.96303	0.93531
pH	$z = 6.3525 + 2.2288 * x - 0.0157 * y - 0.0132 * x * y$	0.99685	0.99449
Surface tension	$z = 45.7093 - 41.7795 * x - 0.0449 * y + 0.2858 * x * y$	0.98839	0.97968
Percentage biodegradation	$z = -3.0721 + 45.9650 * x + 0.1299 * y - 0.1885 * x * y$	0.99052	0.98342

z: 216-h dependent variable x: 0-h biomass y:

Figure Captions

Fig. 1 - Pareto Chart of standardized effects of the initial biomass concentration and agitation rate on the response variables of the 2^2 FFD with 216h: (a) biomass (b) pH (c) surface tension and (d) TPH biodegradation percentage. The point at which the effects estimated were statistically significant (in $p=0.05$) is indicated by the dashed vertical line

Fig. 2 - Fernbach flask scale - Time course of (a) biomass (b) pH (c) surface tension and (d) salinity for the best assay of the 2^2 FFD and correspondent negative, positive and abiotic control.

Fig. 3 - Residual concentrations of Heptane, 2,3,4-trimethyl- (7C_br); Octane, 2-methyl- (8C_br); Nonane; Decane, 2-methyl- (10C_br); Undecane, 4-methyl (11C_br); Dodecane, 2,7,10-trimethyl- (12C-br); Tridecane, 3-methylene- (13C=br) at 0h and 216 h.

Fig. 4 - Times courses of diesel oil biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988 in seawater supplemented with ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate in: (i) 2.8.L Fernbach scale and (ii) 5 L bench-bioreactor scale.

Fig. 5 – Diesel oil biodegradation and biofilm formation by *C. lipolytica* UCP 0988 in seawater supplemented with ammonium sulphate and potassium monobasic phosphate in 2.8.L Fernbach scale at 96 h and in 5 L bench-bioreactor scale at 0h, 96 h, 168 h and 192 h.

Fig. 6 – GC-MS analysis of biodegradation of 10% (v/v) B7 diesel oil in 5L bioreactor by *C. lipolytica* UCP 0988. (a) Abiotic control sample at 0h, (b) Abiotic control sample at 216h, (c) Biotic test sample at 0h and (d) Biotic test sample at 216 h.

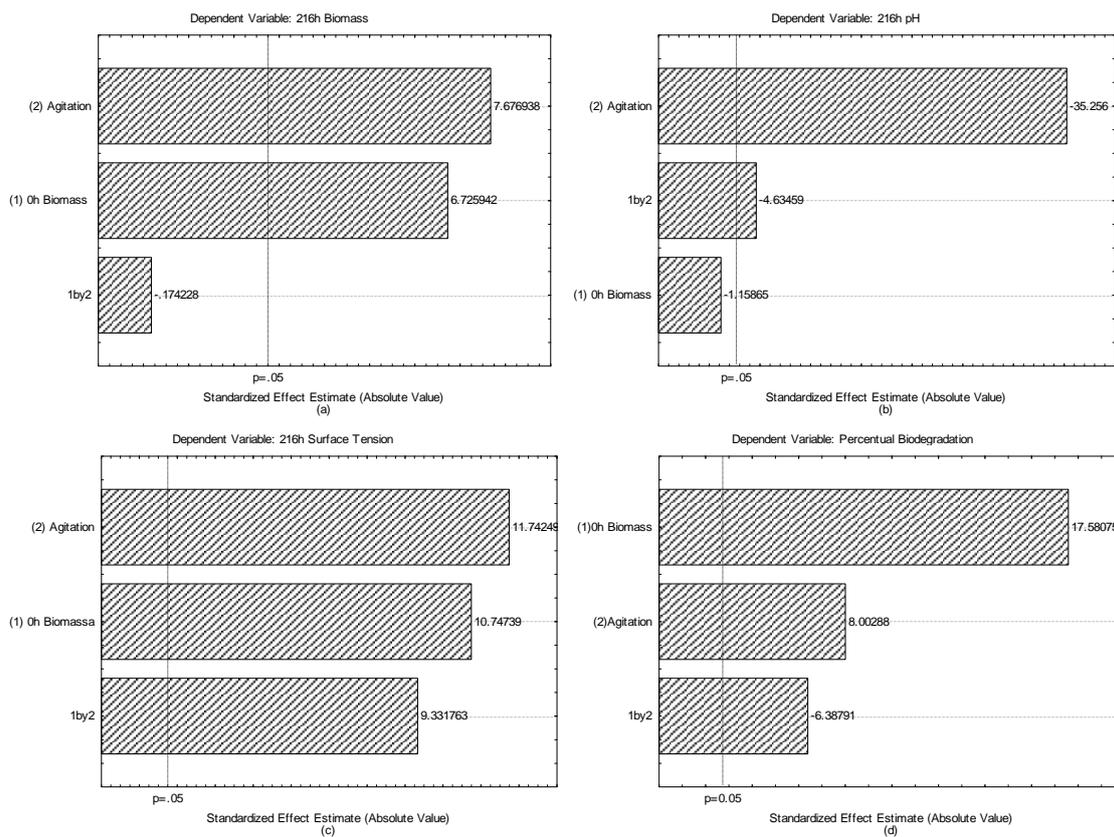


Fig.1

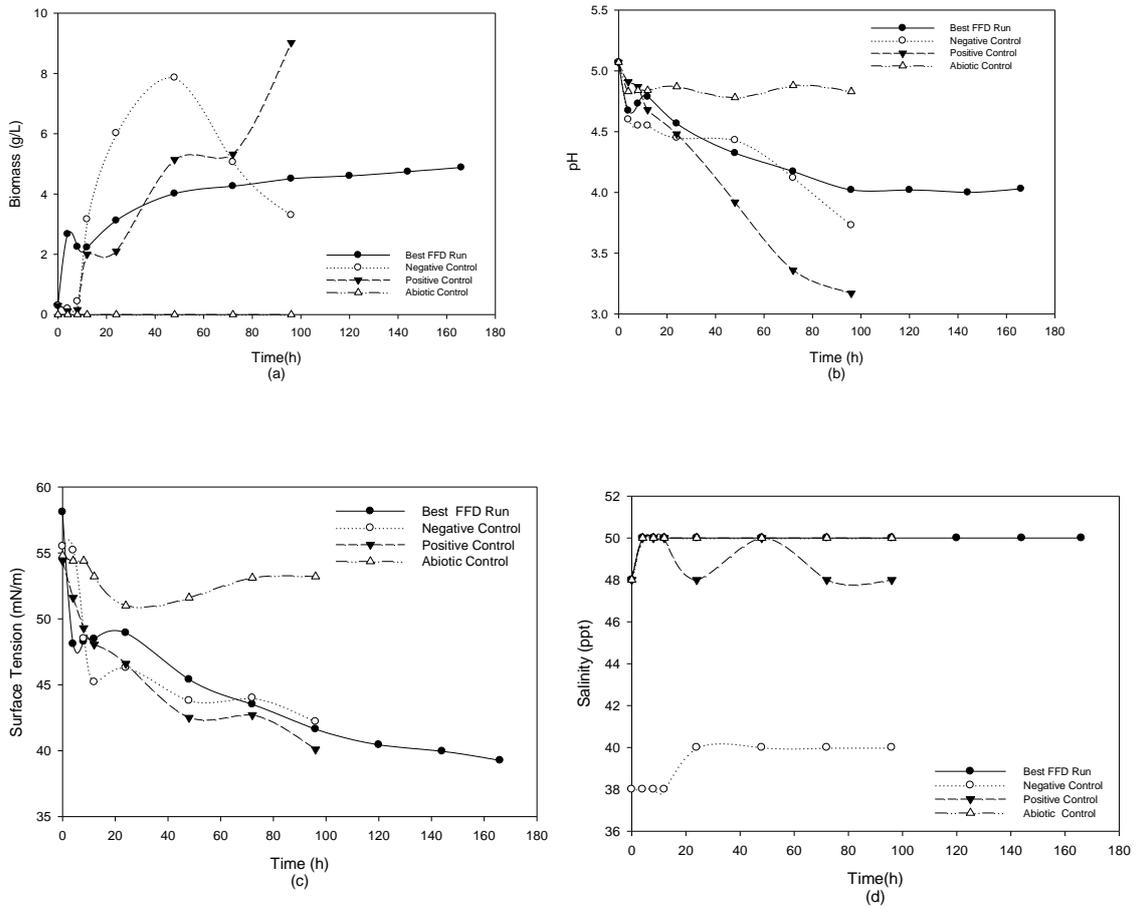
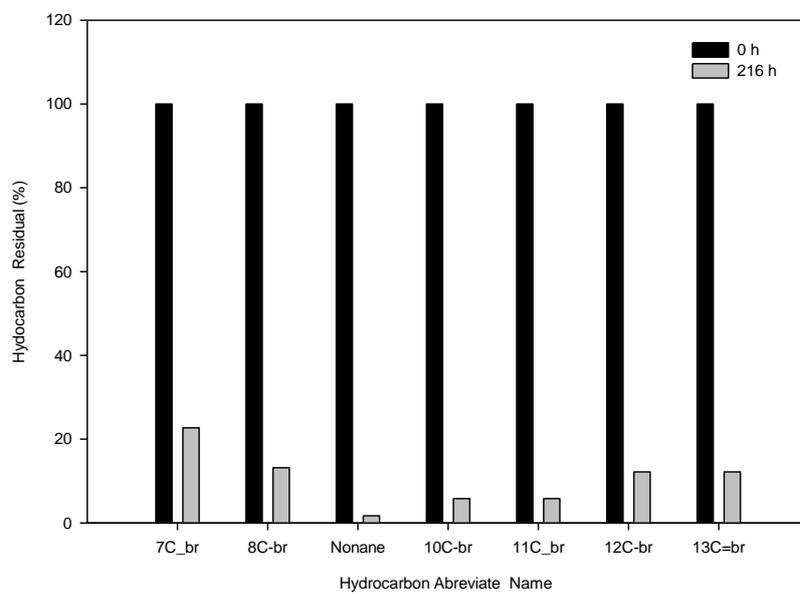


Fig. 2

**Fig.3**

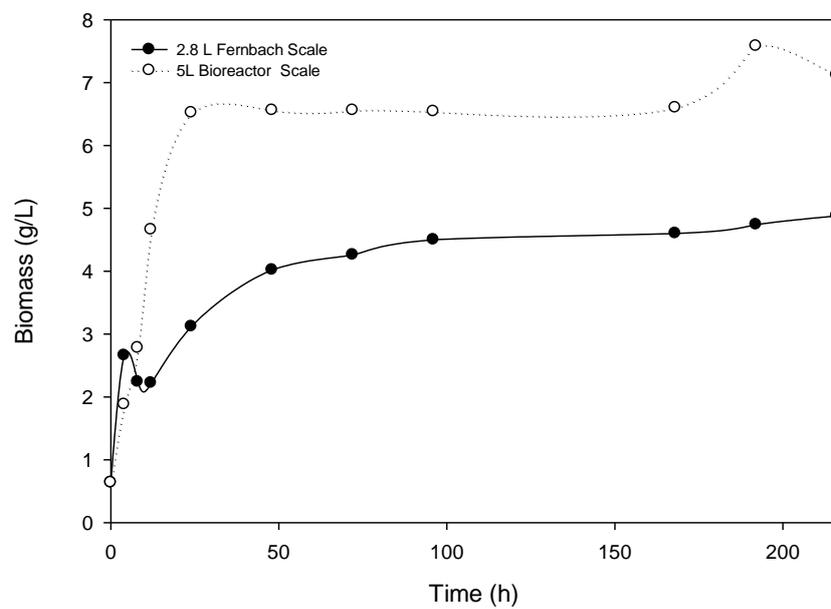
**Fig.4**



Fig.5

Anexo VI: Normas para escrita e submissão de manuscrito – Marine Pollution Bulletin

Marine Pollution Bulletin

Guide for Authors

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and

Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Abstract

Abstracts should not exceed 150 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Where relevant these should include the main species concerned, the geographical area and the contaminant. Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Please note that the instructions related to Abstract and Graphical abstract still apply to all new submissions.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this

reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

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

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

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

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage.

Anexo VII: Notificação da Submissão do artigo II para publicação

Gmail - Your recent submission to MPB



Hamilton Nobrega <hamilton.nobrega@gmail.com>

Your recent submission to MPB

1 message

Marine Pollution Bulletin <mpb@elsevier.com>
To: hamilton.nobrega@gmail.com

Fri, Oct 28, 2016 at 11:41 PM

Dear Dr. Hamilton Felix Nobrega,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Marine Pollution Bulletin
Corresponding Author: Clarissa Daisy Costa Albuquerque
Co-Authors: Hamilton Felix Nobrega, M.Sc.; Fabiane Seger; Maria Andreza Bezerra Correia; Maria Luisa Oliveira Mergulhão Freitas Henriques, M.Sc.; Galba Maria Campos-Takaki, Ph.D
Title: Scale-up of *Candida lipolytica* UCP 0988 biofilm-mediated diesel biodegradation in seawater

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at cdaisy@unicap.br; albqqs@yahoo.com.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/mpb/l.asp?i=82674&I=DZNC9EVL>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Marine Pollution Bulletin