



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

Jupiranan Ferreira da Silva

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

Recife
2012

Jupiranan Ferreira da Silva

BIODEGRADAÇÃO DE QUEROSENE POR *Candida lipolytica* EM ÁGUA DO MAR

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

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

Orientadora: Prof. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Recife/ 2012

Silva, Jupiranan Ferreira da

Biodegradação de Querosene por *Candida lipolytica* em Água do Mar./ Jupiranan Ferreira da Silva; orientadora Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco.

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Biodegradação. 2. Querosene. 3. Água do mar. 4. *Candida lipolytica*. 5. Biossurfactante. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

BIODEGRADAÇÃO DE QUEROSENE POR *Candida lipolytica* EM ÁGUA DO MAR

JUPIRANAN FERREIRA DA SILVA

Examinadores:

Profª. Drª Clarissa Daisy da Costa Albuquerque - Orientadora
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profª Drª Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profª Drª Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

A Meus pais
Neuma e Ferreira

*Cada gesto, pensamento
ou palavra aqui contido...
As alegrias que pude sentir...
Todo empenho, esforço e superação...
Os sonhos que almejei e realizei...*

Conheces-me bem...

Cada pensamento de alegria ou de tristeza,

Quer deitada, quer andando ou dormindo,

Os sonhos que desejei um dia...

Até quando me voltei pra olhar uma segunda vez e chorei!

Encontrou-me, me tirou do abismo...

Deu-me uma nova vida, algo pelo que buscar, um caminho a seguir,

Presenteou-me com amigos, queridos companheiros pro meu coração amar!

Repousa em mim **Teu** conforto, pois encontro em **Ti** toda paciência e entendimento que preciso...

Senhor!!!

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Prof^a Dr^a. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, pelos ensinamentos, atenção, compreensão e ética durante o decorrer desse convívio que se iniciou desde o PIBIC;

À Coordenadora do curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais - MDPA; Prof^a Dr^a. Alexandra Amorin Salgueiro pela bondade, paciência, incentivo e aconselhamento;

À Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP; Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos-Takaki pelo exemplo de dedicação e ensinamento transmitido, por disponibilizar as instalações, equipamentos e insumos para o desenvolvimento do meu projeto;

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP; Prof.Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Prof^a.Dr^a.Aline Elesbão do Nascimento e Prof^a.Dr^a. Kaoru Okada pela disponibilidade, atenção, consideração, profissionalismo e bom convívio;

Aos funcionários D. Sônia Maria, Sr. Humberto, André Felipe e Charles Francisco que vêem, ouvem e *sabem de tudo*.....

À companheira e grande Amiga Maria Helena por todos os momentos compartilhados, pela bagagem emocional enriquecedora experimentada e por saber que, o que somos nada mais é que uma imagem pelo outro projetada do sentimento que *fica na lembrança!*

Ao grande Amigo do meu coração, companheiro Henrique Freitas, pelo exemplo de ser humano compreensivo, calmo, paciente e gentil, pelos momentos de alegria e descontração e pelo *Dom do abraço !!!*

As amigas e companheiras Layla Manhke, Amanda Mota, Marília Montenegro, Rita de Kássia, Ana Cláudia, Diêgena Maciel, Brindize Lima, Jaceline Maria, Fabíola Almeida, Rosileide Fontenele, Aline Barbosa e Alícia Jara, por cada momento vivido e boas *lembrança guardadas!*

As bolsistas de pós-doutorado Patrícia Souza e Marta Cristina pelo exemplo de companheirismo, atenção e *ensinamentos!*

Àqueles amigos que compartilharam comigo essa caminhada, lá trás, desde a graduação e que por algum motivo tiveram que se distanciar e trilhar novos caminhos... Mas, que continuam, como saudosas e boas lembranças, junto a mim!,

Àqueles que estão chegando cheios de energia e disposição e que com certeza trarão *algo de bom, sempre!*

À FACEPE pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	2
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo Geral	5
1.2.2 Objetivos Específicos	5
1.3 Revisão da Literatura	6
1.3.1 Importância Ambiental de Oceanos e Mares	6
1.3.2 Poluição de Oceanos e Mares	7
1.3.3 Impactos Ambientais da Indústria Petrolífera	7
1.3.4 Petróleo	8
1.3.4.1 Hidrocarbonetos Saturados	8
1.3.4.2 Hidrocarbonetos Insaturados	9
1.3.4.3 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's)	9
1.3.4.4 Produtos Derivados de Petróleo	10
1.3.5 Querosene	10
1.3.6 Remediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados	12
1.3.7 Biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados	13
1.3.7.1 Biorremediação intrínseca ou natural	13
1.3.7.2 Bioestimulação	14
1.3.7.3. Bioaumento	14
1.3.8 Parâmetros de Controle da Biodegradação	14
1.3.9 Micro-organismos Degradadores de Hidrocarbonetos (HC)	15
1.3.10 Micro-organismos Degradadores de Hidrocarbonetos e Produtores de Biossurfactantes	16
1.3.11 Leveduras	18
1.3.12 <i>Candida lipolytica</i> (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	19
1.4 Referências Bibliográficas	22

Capítulo 2	36
Primeiro Artigo - Biodegradação de querosene e produção de bioemulsificantes /biossurfactantes pela levedura halo-álcali-tolerante <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar	37
Resumo	38
1. Introdução	39
2. Materiais e Métodos	40
3. Resultados e Discussão	43
4. Conclusão	47
5. Referências Bibliográficas	48
Anexos	51
Tabelas	51
Figuras	54
Capítulo 3	59
Segundo Artigo - Biodegradação de Querosene e Produção de Biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar ácida ou alcalina com baixa oxigenação	60
Resumo	61
1. Introdução	62
2. Materiais e Métodos	63
3. Resultados	69
4. Conclusão	87
5. Referências Bibliográficas	88
Anexos	96
Tabelas	96
Figuras	100
CAPÍTULO 4	111
Conclusões Gerais	112

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e concentrações de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a concentração da biomassa com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical..... 55
- Figura 2** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical 56
- Figura 3** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e concentrações de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical 57
- Figura 4** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e concentrações de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de motor com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical 58

Capítulo 3

- Figura 1-** Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a concentração de biomassa e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio..... 100
- Figura 2** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a tensão superficial e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio..... 101
- Figura 3** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-motor e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio 102

- Figura 4** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-milho e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio 103
- Figura 5** - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta o pH final e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio 104
- Figura 6**- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a salinidade e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio 105
- Figura 7**- Cinética de crescimento e biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 106
- Figura 8** - Ensaio de biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* crescida em água do mar (ou água destilada) com pH inicial 6, a 28° C e 200 rpm, durante 96 horas e controles positivo, negativo e estéril. (a) Melhor ensaio de biodegradação: ensaio 3 (E3.1) em água do mar (b) Controle positivo (CP.3.1) do ensaio 3 em água do mar (c) Controle negativo (CN.1) do ensaio 3 em água do mar (d) Controle estéril (CE.1) do ensaio 3 em água do mar (e) Controle em água destilada do ensaio 3 (E3.2) (f) Controle positivo (CP.2) do ensaio controle E3.2 (g) Controle positivo (CP.2) do ensaio controle E3.2 (h) Controle estéril (CE.2) do ensaio controle E3.2..... 107
- Figura 9** - (a) Emulsificação de óleo de milho com 72 h de repouso. Tubos 1-4: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água do mar. Tubos 5-8: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água destilada. (b) Emulsificação óleo de milho após 96 h de repouso. Tubos 1-4: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água do mar. Tubos 5-8: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água destilada 108
- Figura 10** - Resultados de teste de fitotoxicidade de líquido degradado por *Candida lipolytica* UCP 0988 sobre a germinação de feijão macaçar (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.). Placas superiores (da esquerda para a direita) – Placas controles com querosene, água destilada e água do mar. Placas inferiores (da esquerda para a direita) – Placas com material biodegradado livre de células, nas condições do ensaio 3 e dos respectivos controles positivo, negativo e estéril, exceto pela substituição de água do mar por água destilada 109

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 - Caracterização físico- química da água do mar	51
Tabela 2 - Níveis e valores dos fatores do planejamento fatorial completo 2^4	52
Tabela 3 - Composições dos meios de produção e resultados, com 120h, de biomassa, atividade de emulsificação e tensão superficial dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^4 , realizado em escala de frascos	53

Capítulo 3

Tabela 1 - Caracterização físico-química da água do mar	96
Tabela 2 - Níveis e Valores dos fatores do Planejamento Fatorial Completo 2^4	97
Tabela 3 - Composições dos meios de biodegradação de querosene e produção de bioemulsificantes/biossurfactantes e resultados, com 96h, de biomassa, atividade de emulsificação e tensão superficial dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^4 , realizado em escala de frascos	98
Tabela 4 - Resultados de teste de fitotoxicidade com feijão macacacar (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) WALP.)	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BE/BS	- Bioemulsificante /Biossurfactante
R²	- Coeficiente de Determinação
μ_{max}	- Velocidade de crescimento celular máxima
t_g	- Tempo de Geração

RESUMO

Derramamentos de petróleo e derivados, como querosene e diesel, em água do mar são motivos de preocupação mundial devido aos sérios efeitos causados ao meio ambiente marinho e costeiro. A taxa de biodegradação de hidrocarbonetos em água do mar é afetada por inúmeros parâmetros físico-químicos e biológicos, incluindo o número e a diversidade de micro-organismos endógenos, as condições para a atividade de degradação microbiana (presença de nutrientes, oxigênio favorável e condições de pH e temperatura), a quantidade, a qualidade e a biodisponibilidade dos contaminantes e características da água do mar. Neste trabalho, dois planejamentos fatoriais completos 2^4 foram realizados para analisar a influencia do pH (6; 10 e 14) e das concentrações de querosene e nutrientes (sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) sobre degradação de querosene e produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar. A água do mar usada nos ensaios foi coletada em praia próxima ao Porto de Suape, Pernambuco, Brasil. Os ensaios de biodegradação foram realizados à temperatura de 28°C, em um agitador rotatório a 200rpm, durante 5 dias. A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 foi capaz de utilizar querosene (10%, 20% ou 30% v/v) e crescer em água do mar, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, produzindo biossurfactantes com altas atividades de emulsificação. A fitotoxicidade de amostras biodegradadas coletadas com 5 dias foi avaliada usando técnicas de germinação e crescimento radicular de feijões-macáçar (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.)

Palavras-Chaves: biodegradação, querosene, água do mar, *Candida lipolytica*, biossurfactante, planejamento fatorial.

ABSTRACT

Spills of oil and oil products, such as kerosene and diesel in seawater are cause for concern worldwide due to serious effects caused to the marine and coastal environment. The rate of biodegradation of hydrocarbons in sea water is affected by many physical, chemical and biological parameters, including the number and diversity of endogenous microorganism, the conditions for microbial degradation activity (presence of nutrients, oxygen and favorable conditions pH and temperature), the quantity, quality and bioavailability of contaminants and characteristics of sea water. In this work, two 2⁴ full factorial designs were carried out to analyze the influence of pH (6, 10 and 14) and concentrations of kerosene and nutrients (ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic) on degradation of kerosene and production bioemulsifiers/biosurfactants by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater. The seawater used in the tests was collected near the beach in Suape Harbor, Pernambuco, Brazil. The biodegradation tests were performed at the temperature of 28 ° C, on a rotatory shaker at 200 rpm, for 5 days. The yeast *C. lipolytica* UCP 0988 was able to use kerosene (10%, 20% or 30% v / v) and grows in seawater, supplemented with ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic, producing biosurfactants with high emulsification activity. The phytotoxicity of biodegraded samples collected with 5 days was evaluated using seed germination and root elongation techniques with Makassar beans (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

Key words: biodegradation, kerosene, seawater, *Candida lipolytica*, biosurfactant, factorial design.

Capítulo 1

1.1 INTRODUÇÃO

A poluição de ecossistemas marinhos por hidrocarbonetos é sempre causa de preocupação (LEAHY e COHLWELL, 1990). Derramamentos de petróleo e seus derivados podem ocorrer por diversos motivos, tais como, falha no equipamento, acidentes, atitudes deliberadas ou erro humano (ANDERSON e LABELLE, 2000).

O vazamento de petróleo no Golfo do México em 2010 já é o pior na história (KING, 2010) e superou o provocado pelo acidente do petroleiro Exxon Valdez no Alasca em 1989, que derramou mais de 40 milhões de litros de petróleo (BODKIN et al., 2002). A refinaria Abreu e Lima - instalada no Porto de Suape, Pernambuco - irá processar petróleo bruto. A refinaria aumentará o desenvolvimento sócio-econômico da região e também a responsabilidade técnico-científica com a prevenção e a remediação de contaminação do solo e da água por petróleo e derivados.

A biorremediação pode ser considerada como uma tecnologia alternativa para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. Estratégias de biorremediação incluem: a utilização de micro-organismos autóctones, ou seja, do próprio local sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutriente, oxigênio e biossurfactante (bioestimulação); a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2005). Uma biorremediação bem sucedida de sistemas contaminados por petróleo e seus derivados, requer conhecimento das características do lugar e dos parâmetros que afetam a biodegradação microbiana dos poluentes (SABATE et al., 2004).

Diversos fatores afetam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente. Exemplos típicos destes fatores limitantes são: composição química dos hidrocarbonetos de petróleo, estado físico, intemperismo, temperatura, nutrientes minerais, reações (pH baixos podem ser limitantes) e micro-organismos, entre outros. Apesar das bactérias serem provavelmente as maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente, os fungos filamentosos e as leveduras (CERNIGLIA e GIBSON, 1977; OUDOT et al., 1987; MACGILLIVARY & SHIARIS, 1993), as cianobactérias, as algas e mesmo os protozoários apresentam capacidade de degradação (CERNIGLIA et al., 1979).

Um número considerável de estudos sobre bactérias e fungos terrestres e aquáticos degradadores de hidrocarbonetos e produtores de biossurfactantes e emulsificantes tem sido publicado na literatura. Existem também vários relatos sobre degradação de hidrocarbonetos melhorada pela adição de biossurfactante ou surfactante químico (RAHMAN et al., 2003; KUYUKINA et al., 2005).

Estudos sobre efeitos da produção de biossurfactante *in situ* por co-cultura de bactéria produtora de biossurfactante e degradadora de hidrocarboneto, embora em menor número, também têm sido alvo de pesquisas (DEAN et al., 2001; VAN HAMME e WARD, 2001). Entretanto, leveduras marinhas não têm sido estudadas extensivamente para produção de surfactantes e emulsificantes, em água do mar, usando hidrocarbonetos derivados de petróleo como única fonte de carbono. A levedura *Candida lipolytica* NCIM 3589 isolada de água do mar contaminada perto de Bombay, produziu um complexo lipídio-carboidrato-proteína, termoestável, com propriedades emulsificantes, quando crescida em um meio de água do mar artificial, contendo 1% (v/v) de n-hexadecano, como única fonte de carbono (ZINJARDE et al., 1997). O biossurfactante produzido apresentou amino-ácidos com composição semelhante a do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*. O emulsificante foi capaz de estabilizar emulsões óleo-em-água com hidrocarbonetos aromáticos, tais como tolueno, xileno, benzeno e l-metil-naftaleno. Com óleo bruto e n-alcanos, as gotas dispersadas separaram em duas fases e, portanto a formação da emulsão foi instável (PAREILEUX, 1979). Singh e Desai (1989) descreveram um emulsificante de *Candida tropicalis* também ativo sobre hidrocarbonetos aromáticos, embora as culturas tenham crescido sobre n-alcano, como única fonte de carbono.

Outros trabalhos sobre produção de emulsificantes por *Candida lipolytica* UCP 0988, empregando água do mar diluída a 50%, mas usando como fonte de carbono, óleo de milho (VANCE-HARROP et al., 1999; VANCE-HARROP 2000; ALBUQUERQUE et al., 2006; ALBUQUERQUE, 2006) e óleo de babaçu (VANCE-HARROP et al., 2003), também investigaram e constataram a influência da uréia, do sulfato de amônia e do fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação. Estudo realizado por Souza (2009) ratificou a importância do pH e de fontes de nitrogênio (sulfato de amônio) e fósforo (fosfato monobásico de potássio) sobre a degradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar.

Os nutrientes são muito importantes para uma biodegradação bem sucedida de poluentes, especialmente nitrogênio, fósforo e em alguns casos ferro (CONNAY, 1984; LEAHY e COLWEL,

1990; ATLAS, 1984). Quando um grande derramamento de óleo ocorre em ambientes marinhos e de água fresca, o fornecimento de carbono é dramaticamente aumentado e a disponibilidade de nitrogênio e fósforo torna-se o fator limitante para a degradação do óleo (ATLAS, 1984). Petróleo e seus derivados são parcialmente biodegradáveis, mas essencialmente não contem nitrogênio, fósforo e outros elementos traços que são necessários para estimular a biodegradação.

A poluição devido a produtos leves de petróleo, como gasolina, é tratada eficientemente por processos físico-químicos naturais. Entretanto, combustíveis mais pesados como diesel e o querosene levam meses para completa remediação natural devido as suas baixas volatilidades (PAVITRAN et al., 2006). O querosene é um líquido, incolor, inflamável, formado por uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, naftênicos e aromáticos, com faixa de destilação compreendida entre 190 e 290°C (Von MÜHLEN et al., 2006) e apresenta muitos efeitos tóxicos sobre plantas, animais e os seres humanos (SONG e BARTHA,1990).

Informações consideráveis sobre a degradação microbiana de determinados hidrocarbonetos simples encontram-se disponíveis na literatura, mas pouco se sabe sobre a biodegradabilidade de alguns produtos comerciais de petróleo (SUGIURA et al., 1997), como querosene (NOCENTINI et al.1997, 1998). Segundo o sistema de notificação de emergências da guarda costeira dos Estados Unidos, o querosene é um dos produtos petrolíferos mais comumente derramados em ambiente marinho (GOUDA et al., 2007). Biodegradação apresenta-se como uma das principais ferramentas para controle de poluição por hidrocarbonetos, o que justifica o número crescente de pesquisas nesta área; entretanto estudos em laboratório e em campo, sobre biodegradação de querosene em ambiente marinho são ainda bastante limitados. Dentro deste contexto, a presente dissertação visa contribuir com os estudos sobre biorremediação de petróleo e derivados em água do mar, mas especificamente sobre a degradação de querosene e a produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* em água do mar.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar planejamentos fatoriais completos para avaliar os efeitos do pH inicial e das concentrações de querosene, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração de biomassa, a tensão superficial, a atividade de emulsificação, o pH final e a salinidade de meios de biodegradação e produção de bioemulsificante/biossurfactante.
- Avaliar o potencial de degradação de querosene por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.
- Avaliar o potencial de produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.
- Avaliar a toxicidade do querosene bioprocessado sobre a germinação e o crescimento radicular de feijões macaçar (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.).

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Importância Ambiental de Oceanos e Mares

A vida em nosso planeta depende dos oceanos, que são fontes de oportunidade, riqueza e abundância. Cerca de 71% da superfície deste planeta é coberta por água salgada. Os oceanos nos fornecem alimentos, energia, água e mantêm o sustento de centenas de milhões de pessoas. De acordo com a Avaliação da Biodiversidade Global (Global Biodiversity Assessment), produzido pelo Programa Ambiental das Nações Unidas, existem 178.000 espécies marinhas em 34 filos (SUBRAMANIAN, 1998).

Um ambiente marinho diversificado é condição primordial para a vida no planeta. Durante o curso do desenvolvimento da terra uma enorme diversidade de formas de vida foi criada. As atividades humanas têm um grande efeito sobre os ecossistemas e têm provocado a extinção de várias espécies. Extinção - superior a de qualquer outro período dos últimos 60 milhões de anos - cujo grau está aumentando, devido à destruição sistemática de ecossistemas biologicamente diversos e a ruptura de habitats. Embora, ainda não esteja completamente claro, o impacto que tal perturbação terá sobre as formas de vida na terra, ele reduzirá a capacidade de resposta da biosfera aos contrastes e conseqüentemente as possibilidades das diversas formas de vida, inclusive humana, sobreviverem em condições novas e variadas (FRIOLEIFSDOTTIR et al., 2004).

No entanto, a importância de oceanos e mares não se limita a biodiversidade e a sua ação sobre ciclos de nutrientes, ou seu potencial bioquímico e farmacológico. Todo o processo de regulação climática do planeta e os ciclos hidrológicos dependem da enorme massa de água disponível e de sua capacidade de armazenar calor (apenas a camada superficial de 2 a 3 metros é capaz de armazenar mais calor que toda a atmosfera) e absorver de gás carbônico - cerca de 2 bilhões de toneladas por ano (JABLONSKI, 2003).

Além dos aspectos climáticos e meteorológicos, os oceanos são fundamentais por outros motivos: o comércio internacional se utiliza bastante da marinha mercante para transportar as mais variadas mercadorias, e programas de defesas nacionais são cada vez mais dependentes de operações navais. Da mesma forma, os recursos minerais encontrados nos fundos dos oceanos, entre eles o petróleo e o gás natural, representam fontes de energia valiosas e

propulsoras da sociedade moderna, e sua extração transformou-se em um dos negócios mais lucrativos do planeta, gerando riquezas incalculáveis (SANTOS, 2006).

1.3.2 Poluição de Oceanos e Mares

Os mares e oceanos têm sido utilizados como lixeira por várias décadas e a conscientização dos riscos da poluição é algo recente em nossa sociedade (LITERALHY, 1993).

A Lei sobre a Prevenção da Poluição Oceânica, n.º 32/1986, define poluição oceânica como aquela que ocorre quando micro-organismos, substâncias químicas e compostos químicos, introduzidos nos oceanos, têm um efeito indesejável ou nocivo sobre a saúde pública, perturbam a biosfera ou contaminam solo, ar ou água. Poluição oceânica também inclui desconforto devido ao mau cheiro ou gosto, qualquer tipo de ruído ou vibração, radioatividade, e transferência de calor. A Convenção OSPAR, que diz respeito à proteção do ambiente marinho, define poluição marinha como a introdução pelo homem, direta ou indiretamente, de substâncias ou de energia na zona marítima, que resultem, ou possam resultar, em perigo a saúde humana, danos a recursos vivos e ecossistemas marinhos, prejuízos a áreas aprazíveis ou interferência em outros usos legítimos do mar (FRIOLEIFSDOTTIR et al., 2004).

Para um mundo que baseia grande parte de sua existência sobre a utilização de recursos da vida marinha, é importante que aos oceanos e seus recursos seja dada proteção suficiente contra a poluição e outros impactos ambientais antropogênicos adversos (KENNEDY et al., 2002).

1.3.3 Impactos Ambientais da Indústria Petrolífera

As atividades do setor petrolífero podem gerar grandes impactos ambientais. Durante a produção, refino, distribuição e transporte de petróleo e seus derivados, além do elevado consumo de água e energia, diversos gases nocivos são liberados para a atmosfera e grandes quantidades de despejos líquidos e resíduos sólidos de difícil tratamento e armazenamento são produzidos. Devido à grande variedade de processos e operações realizadas, o armazenamento e liberação inadequada desses resíduos e do próprio produto no ambiente, podem ocasionar sérios problemas e acidentes, como vazamentos e explosões, devido a falha humana ou do equipamento ou por erros deliberados (ANDERSON e LABELLE, 2000; MORENO; CORSEUIL, 2001).

Os ambientes marinhos e costeiros estão entre os mais atingidos, devido a proximidade com o local de refino e/ou transporte desses óleos ou efluentes, cuja principal característica é o

espalhamento sobre as águas marítimas, formando uma camada que impede as trocas gasosas e a passagem da luz. Isso provoca a asfixia dos animais e impossibilita a realização da fotossíntese por parte dos vegetais e do plâncton e também induz efeitos relacionados não apenas ao volume derramado, que podem prejudicar a curto, médio e longo prazo uma remediação de todo local impactado (MARIANO, 2001).

Utilização sustentável de recursos, baseada em princípios de desenvolvimento sustentável, é a chave para a conservação e o gerenciamento racional e responsável dos recursos dos oceanos e mares. O gerenciamento dos recursos da vida marinha deve se fundamentar em pesquisas e recomendações científicas e em uma estrutura legal que realmente reflita os conceitos e os objetivos do desenvolvimento sustentável (KENNEDY et al., 2002).

1.3.4 Petróleo

O petróleo pode ser tratado como uma mistura sólida, líquida ou gasosa, complexa, de ocorrência natural, formada predominantemente por hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos. Apresenta freqüentemente quantidades significativas de nitrogênio, enxofre e oxigênio, além de pequenas quantidades de níquel, vanádio e outros elementos. Os hidrocarbonetos do petróleo podem ser classificados em função de sua estrutura molecular como alifáticos ou cíclicos. Os hidrocarbonetos alifáticos possuem cadeias abertas, saturadas ou não, e são compostos pelos n-alcanos (ou parafinas) e isoalcanos. Os hidrocarbonetos cíclicos são aqueles que possuem estruturas fechadas, podendo também ser ramificados e são compostos pelos ciclo-alcanos (naftênicos) e aromáticos. A composição química do petróleo é muito diversificada e depende de vários aspectos como: composição da matéria orgânica, temperatura da maturação da matéria orgânica, ambiente geológico onde foi formado etc (TISSOT; WELTE, 1984). Em média, o petróleo apresenta cerca de 30% de alcanos, 50% de ciclo alcanos e 15% de aromáticos (UNEP, 1991).

1.3.4.1 Hidrocarbonetos Saturados

Os hidrocarbonetos saturados possuem ligações simples entre seus átomos de carbono e são encontrados em maiores quantidades no petróleo. Podem ser classificados em alcanos normais, ramificados e cíclicos (TISSOT e WELTE, 1984). Os alcanos normais ou n-alcanos (C_nH_{2n+2}) são moléculas com cadeia de carbono lineares e sem ramificações. Possuem de um a quarenta átomos de carbono, sendo raramente encontradas moléculas de maior peso molecular

ou com um número de carbono acima de 40. Os n-alcanos com mais de vinte átomos de carbono são conhecidos como alcanos de alto peso molecular e os menores como alcanos de baixo peso molecular (TISSOT e WELTE, 1984; BLANC e CONNAN, 1994).

1.3.4.2 Hidrocarbonetos Insaturados

Os hidrocarbonetos insaturados contém um número menor de hidrogênio por átomos de carbono, quando comparados aos n-alcanos. Possuem ligações duplas ou triplas entre seus átomos de carbono e são quimicamente instáveis, podendo ser encontrados no petróleo, por exemplo, na forma de n-hexeno, n-hepteno e n-octeno (BLANC e CONNAN, 1994).

Devido sua estrutura molecular carbono-carbono insaturado, estes compostos vêm sendo estudados para a utilização na produção de compostos de alto valor agregado, através de reações de metátese da porção olefínica da molécula que ocorre por catálise, levando a formação de outros olefínicos após uma recombinação desses fragmentos, gerando a partir disso diversos resultados como o fechamento dos anéis, troca de elementos constituintes, formação de dienos, polimerização, etc (AMAS, 1989).

A partir de oleatos e linoleatos pode-se obter ésteres dicarboxílicos insaturados, que são matérias-primas para a síntese de poliésteres, poliamidas etc, constituindo um exemplo a metátese cruzada do oleato de metila com eteno, que leva à formação de 9-decenoato de metila. Este último pode ser empregado na síntese de vários polímeros e copolímeros, tal como o nylon-1076 (MOL, 1994).

1.3.4.3 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

As moléculas dos hidrocarbonetos aromáticos são formadas por uma estrutura fechada na forma de anel com seis átomos de carbono. O benzeno (C_6H_6) apresenta estrutura molecular cíclica com ligações simples e duplas intercaladas, sendo o hidrocarboneto aromático mais simples da classe. No petróleo são encontrados hidrocarbonetos aromáticos formados pela fusão de dois ou mais anéis benzênicos denominados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's). Os compostos com até quatro anéis benzênicos são os mais abundantes, sendo conhecidos como: naftaleno (2 anéis); antraceno e fenantreno (3 anéis); pireno, benzo(a)antraceno e criseno (4 anéis) (SPEIGHT, 1991).

Existe uma imensa variedade de HAP's no meio ambiente, grande parte deles possuindo características estruturais e propriedades muito similares entre si, sendo comum à existência de isômeros (GRISOLIA, 2000). As propriedades químicas e físicas dos HAP's são em grande parte determinadas por seus sistemas de duplas ligações conjugadas, que variam com o número de anéis e, portanto, com sua massa molécula (PAJÉ, 1998).

Os compostos aromáticos apresentam elevada toxicidade e a gravidade da intoxicação depende da natureza do composto aromático, da quantidade ingerida ou inalada e do tempo de exposição (BANJOO, 2005). Os HAP's além de provocarem sérios problemas a saúde humana, mesmo em baixas concentrações, também são cumulativos nos diversos micro-organismos expostos (animal ou vegetal) presentes no meio ambiente, em particular nas águas (FATIMA e AHMAD, 2006). Entre os diversos componentes do petróleo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's), são os contaminantes ambientais mais perigosos, devido aos seus efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (AINA et al, 2006).

1.3.4.4 Produtos derivados de Petróleo

Nas refinarias, o petróleo é submetido a destilação fracionada sendo separado nos seguintes produtos: éter de petróleo (20 a 60 °C); benzina (60 a 90 °C); nafta (90 a 120 °C); gasolina (40 a 200 °C); **querosene (150 a 300 °C)**; gasóleo (PT) ou óleo diesel (BR) (250 a 350 °C); óleos lubrificantes (300 a 400 °C). Asfalto, piche e coque são resíduos da destilação fracionada do petróleo.

1.3.5 Querosene

O querosene é um hidrocarboneto incolor, inflamável, líquido e tem muitos efeitos tóxicos sobre as plantas, os animais e os seres humanos (SONG e BARTHA, 1990). É obtido a partir da destilação fracionada do petróleo à 150°C e 290°C, fração entre a gasolina e o óleo diesel, com um número de carbonos na sua maioria dentro do intervalo de C9 a C16. O produto possui diversas características específicas como uma ampla curva de destilação, conferindo a este um excelente poder de solvência e uma taxa de evaporação lenta, além de um ponto de inflamação que oferece relativa segurança ao manuseio, é insolúvel em água (Von MÜHLEN et al., 2006).

Entre os componentes principais do querosene, os constituintes em maior proporção (68%) são as parafinas (alcanos) - com cadeia normal variando entre C₁₁ e C₁₂ - e as cicloparafinas

(cicloalcanos) (ATLAS, 1984). Os aromáticos (13,7%) incluem: toluenos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA (benzeno e benzeno substituído, aquilbenzenos), naftênicos (naftaleno e naftaleno substituído) e olefinas (alcenos), a partir de aproximadamente C₉ a C₂₀ (IRWIN et al., 1997; KALME, 2008).

Quanto às características do processamento de seu refino, o querosene é considerado um composto médio destilado. Os médios destilados incluem, além do querosene comercial (querosene iluminante - QI), o óleo diesel e o óleo combustível. As proporções dos componentes podem variar de um tipo de querosene para outro, ou ainda, de um poço de petróleo para outro (KANIKKANNAN et al., 2001). Em estudos detalhados sobre a composição do querosene através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, foram identificados mais de 20 diferentes HPA's (dentre os que se destacam alquilnaftalenos, acenaftenos, fenantreno, antraceno) e mais de 60 hidrocarbonetos aromáticos em quantidades traços (BERNABEL et al., 2003).

O ponto de ebulição do querosene se situa, normalmente, bem acima do ponto de ebulição do benzeno. Sendo comum encontrar variados tipos de querosene que apresentam ponto de ebulição um pouco mais próximo ao do benzeno, devido às misturas realizadas com esta substância (IRWIN et al, 1999).

Da mesma forma que os demais derivados líquidos do petróleo, o querosene é armazenado em tanques nos terminais de combustíveis. Como são recebidos carregamentos dos mais diversos portos e refinarias, dentro ou fora do território brasileiro, é comum que o material esteja misturado. Desta forma, como as propriedades físico-químicas variam de uma fonte de extração para outra, devem ser considerados valores compreendidos numa faixa que varia entre o máximo e mínimo, especificados para o transporte, armazenamento e distribuição. Esses valores, máximos e/ou mínimos, garantem intervalos ou limites nos quais o produto mantém suas características de combustão, segurança no armazenamento, escoamento e corrosividade, entre outras (ANP, 2000).

De acordo com o Sistema de Resposta de Notificação de Emergência da Guarda Costeira dos EUA, o querosene é um dos produtos petrolíferos mais comumente derramados (GOUDA et al., 2007).

1.3.6 Remediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados

Quando o petróleo é lançado ao mar, o destino final de seus componentes depende de vários processos físicos, químicos e biológicos (chamados de intemperismo), tais como: volatilização, dissolução, dispersão, adsorção no material particulado, sedimentação, biodegradação e fotodegradação. Esses processos determinam o tempo de permanência do petróleo no mar e alteram seu impacto no meio ambiente, dependendo de vários parâmetros ambientais abióticos e bióticos, entre eles: turbulência, temperatura do ar e da água, intensidade de luz e ângulo de incidência, nutrientes, composição e abundância da biocomunidade, direção das correntes marítimas, etc. A distribuição dos componentes do petróleo ocorre em fases bem distintas e significativas em termos de poluição e consequências (COONEY, 1984; ZIOLLI e JARDIM, 2002):

1. Fase vapor: constituída basicamente por hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Esta fase depende da composição do óleo, sua área superficial, da velocidade do vento, temperatura do mar e do ar e da intensidade de radiação solar;

2. Fase do próprio filme de petróleo: composta pelos hidrocarbonetos alifáticos de alto peso molecular. A densidade e a viscosidade do óleo são alteradas com as perdas de hidrocarbonetos voláteis e, em consequência, o espalhamento do óleo e a espessura do filme são afetados

3. Fase dissolvida na água: constituída de hidrocarbonetos com peso molecular intermediário, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) de baixo peso molecular, bem como compostos heterocíclicos que por serem solúveis em água são os principais constituintes da fase aquosa e os maiores contribuintes para a toxicidade nos ambientes aquáticos. Para esse processo de dissolução, além dos fatores já citados, a salinidade, a quantidade de matéria orgânica dissolvida e a presença de surfactantes são também fatores que afetam a dissolução;

4. Fase sedimentada: formada principalmente pela acumulação abiótica, devido às partículas sólidas em suspensão, e pelo material fecal devido à ingestão de óleo pelo zooplâncton.

Os processos de espalhamento, evaporação, dispersão, emulsificação e dissolução são os mais importantes em curto prazo, enquanto a oxidação, sedimentação e biodegradação são certamente os principais processos envolvidos em longo prazo e determinam o destino final dos componentes do petróleo (COONEY, 1984, CRAPEZ, 2001, CRAPEZ, 2002).

A remediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados pode ser realizada no próprio local (remediação *in situ*) ou em outro (remediação *ex situ*), através de métodos físicos e

físico-químicos (barreiras de contenção, bombeamento e tratamento químico, lavagem de solo, extração por vapor estabilização, solidificação, incineração, entre outras) ou métodos biológicos (biorremediação)

A remediação *in situ* (ou *on site*) é mais econômica do que a remediação *ex situ*; já que o transporte da água ou solo contaminado para tratamento em um local mais afastado, muitas vezes é complicado e difícil de se realizar. Entretanto, a remediação *ex situ* apresenta como vantagem a extração da maior parte dos poluentes do local impactado antes deles se espalharem ainda mais no ambiente, gerando uma elevação dos custos, mas permitindo um melhor controle de toda região impactada (FANG e BARCELONA, 2003).

1.3.7 Biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados

Biorremediação pode ser considerada como uma tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. Estratégias de biorremediação incluem: a utilização de micro-organismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2003).

1.3.7.1 Biorremediação intrínseca ou natural

A biorremediação intrínseca ou natural faz uso de micro-organismos autóctones (do próprio ambiente) com capacidade de degradar os contaminantes sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação. Devido ao seu baixo custo e baixa intervenção, a biorremediação passiva recebe grande aceitação, apesar da velocidade lenta do processo e da necessidade de monitoramento constante, contínuo e por tempo indeterminado do local contaminado, para a proteção do homem e do ambiente (MULLIGAN et al., 2001; BENTO et al., 2005).

1.3.7.2 Bioestimulação

A bioestimulação de populações de micro-organismos autóctones através da introdução de nutrientes, fornecimento de oxigênio, ajuste de pH, entre outros estímulos, com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é freqüentemente empregada em projetos de biorremediação. Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se investigar se existe no local contaminado uma população natural de micro-organismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população. Medidas das propriedades físicas e químicas de amostras do local podem revelar as limitações físicoquímicas para a atividade microbiológica, a qual pode então ser modelada para indicar os fatores críticos limitantes (MARIANO, 2006).

1.3.7.3. Bioaumento

A introdução de micro-organismos não endógenos (alóctones) pode ser considerada em locais, onde após a contagem das bactérias heterotróficas totais e fungos, foi identificada uma insuficiência de micro-organismos endógenos (autóctones) para a biodegradação do resíduo perigoso em questão, mesmo após a tentativa da bioestimulação. Esse processo é necessário quando um local contaminado não possui ou possui em quantidades insuficientes os requisitos necessários para que o processo de degradação ocorra. Assim, essa técnica tem como objetivo acelerar ou estimular a biodegradação através da intensificação do crescimento microbiano tanto quanto também pela otimização do ambiente em questão (MARIANO, 2006).

1.3.8 Parâmetros de Controle da Biodegradação

A biodegradação é um processo natural onde os micro-organismos podem degradar os compostos orgânicos contidos no petróleo e seus derivados. Esse processo pode ocorrer tanto sob condição anaeróbicas como aeróbicas (CERQUEIRA e COSTA, 2009). Em condições anaeróbicas a biodegradação ocorre de maneira mais lenta, sendo geralmente realizada por bactérias sulfato-redutoras. Na presença do oxigênio a oxidação dos hidrocarbonetos e seus derivados é mais rápida (BAIRD, 2002). Para micro-organismos em condições aeróbicas é fundamental observar as condições físicas e químicas do ambiente a ser remediado (MORGAN e WATKINSON, 1994; ATLAS, 1995; KING et al., 1997).

Existem diversos outros fatores além do oxigênio, que afetam o processo de biodegradação (LEAHY e COLWELL, 1990). Para que o processo de biodegradação se torne viável, é necessário a seleção e introdução de micro-organismos que degradem os compostos orgânicos responsáveis pela contaminação, utilizando-os como fonte de energia e carbono (CERQUEIRA e COSTA, 2009). Os parâmetros de controle biótico são referentes às necessidades intrínsecas da flora microbiana envolvida (tipo de micro-organismo, adaptação por efeito a exposição prévia ou por alteração da composição genética da comunidade microbiana, entre outros). Os parâmetros de controle abiótico referem-se as propriedades físico-químicas ideais para que o ambiente suporte a microflora e não iniba a produção de enzimas (BAKER e HERSON, 1994; COOKSON, 1995). Entre estes parâmetros destacam-se:

- *Temperatura*: altera as reações químicas que controlam os processos de crescimento microbiano, determinando o ritmo e o desenvolvimento do organismo e seus processos metabólicos.
- *pH*: a maioria dos micro-organismos desenvolvem-se no intervalo de pH entre 6 e 8, havendo poucos, capazes de se desenvolverem fora desse limite;
- *Disponibilidade de Água*: o desenvolvimento e a reprodução dos micro-organismos ocorrem na presença de água disponível no meio ambiente;
- *Foto-oxidação*: este processo atua nos compostos orgânicos gerando produtos mais polares, tornando-os mais solúveis em água e mais facilmente biodegradados
- *Solubilidade*: trata-se de um parâmetro importante, pois quanto maior for a solubilidade do contaminante em água, maior será a biodegradação;
- *Nutrientes*: o desenvolvimento microbiano limita-se a presença de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, os quais auxiliam na síntese da matéria orgânica pela comunidade microbiana. Geralmente, utiliza-se a razão C:N:P= 120:10:1 como sendo a quantidade mínima para o desenvolvimento da flora microbiana.

Materiais tóxicos: a presença de materiais tóxicos pode afetar diretamente os micro-organismos responsáveis pela degradação. Dentre os principais contaminantes tóxicos que podem afetar a biodegradação destacam-se os metais pesados e os HAP's.

1.3.9 Micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos

Os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções

únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Diversos micro-organismos têm sido identificados, metabolizando desde metano até compostos mais pesados. De acordo com a literatura atual, nenhuma espécie de micro-organismo é capaz de degradar completamente um dado óleo. Considerando que o petróleo representa uma mistura complexa de substâncias orgânicas, deve-se salientar que para que sua biodegradação completa ocorra, faz-se necessário uma associação de micro-organismos capazes de degradar todos os compostos contidos no mesmo (PASSOS et al., 2009).

Portanto, aceita-se que para se obter uma mineralização significativa são necessárias diferentes espécies de micro-organismos em culturas puras ou mistas (LEE e LEVY, 1988). Segundo Literathy *et al.* (1989) geralmente os produtos da biodegradação são: gás carbônico (CO₂), água (H₂O), peróxido de hidrogênio, álcoois, fenóis, compostos carbonilados, ácidos adiposos e ésteres. Obviamente, CO₂ e H₂O surgem como resultado da degradação completa (mineralização) dos hidrocarbonetos do petróleo.

Atlas e Bharta (1987) observaram que aproximadamente 50% do petróleo biodegradado pode ser convertido em CO₂ e H₂O. Parte do óleo que é metabolizado forma a biomassa celular e produtos intermediários.

Todo catabolismo realizado pelos consórcios microbianos tem como objetivo utilizar o petróleo e seus derivados como fonte exclusiva de carbono e de energia, desintoxicando conseqüentemente ambientes impactados e auxiliando na recuperação ecológica (PASSOS et al, 2009).

Portanto, locais contaminados por hidrocarbonetos podem ser eficazmente remediados usando micro-organismos - algas, bactérias e fungos - individual e/ou conjuntamente (HARITASH;KAUSHIK, 2009).

1.3.10 Micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos e produtores de biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos anfipáticos de origem microbiana, produzidos por certas bactérias, leveduras e fungos filamentosos, podendo ser produzidos extracelularmente ou como parte da parede celular do micro-organismo.

Os biossurfactantes formam um grupo heterogêneo de moléculas que apresentam propriedades tensoativas. De modo geral, a estrutura dos biossurfactantes envolve uma parte

hidrofílica composta por: aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, mono, di ou polissacarídeos. A parte hidrofóbica freqüentemente é formada por hidrocarbonetos saturados, insaturados ou ácidos graxos hidroxilados ou peptídeos hidrofóbicos (GEORGIU et al., 1992).

Geralmente, a produção de biossurfactantes está relacionada com a assimilação microbiana de hidrocarbonetos. Portanto, a síntese destes compostos é predominantemente dependente da atividade de micro-organismos naturais ou não, potencialmente degradadores destes compostos. No entanto, existem relatos sobre biossurfactantes produzidos a partir de compostos solúveis em água, tais como glicose, sacarose, glicerol e etanol (PALEJWALA; DESAI, 1989; HOMMEL; HUSE, 1993).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como os hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas, usualmente produzem biossurfactantes que auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas (GERSON, 1993).

Muitos dos mais persistentes contaminantes exibem baixa solubilidade em água e assim, a biodisponibilidade dos contaminantes pode freqüentemente ser melhorada pela adição de surfactantes que reduzem as tensões superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, permitindo que eles se dispersem prontamente como emulsões (BANAT et al, 2000, DESAI; BANAT, 1993; DESAI; BANAT, 1997).

O aparecimento de bioemulsificantes ou compostos de superfície ativa no meio de cultura ou unido às paredes celulares é geralmente considerado um pré-requisito para as interações iniciais entre os hidrocarbonetos e a célula microbiana, porque reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, diminuindo o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciando o aumento da área interfacial (HOMMEL, 1990).

Os biossurfactantes podem ser utilizados *in situ* para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos e dessa forma facilitar o acesso dos micro-organismos naturalmente presentes no ambiente para que ocorra a degradação dos compostos hidrofóbicos (CAMEOTRA, BOLLAG 2003, BENTO, 2005). A eficácia dos mesmos depende das suas propriedades funcionais (MAIER; SOBERRON-CHAVES, 2000).

Uma grande variedade de micro-organismos são capazes de produzir biossurfactantes que, atuam no aumento da biodisponibilidade dos variados compostos de estruturas moleculares distintas dos hidrocarbonetos degradados (DELEU; PAQUOT, 2004). O potencial de produção é determinado pela genética do micro organismo e juntamente com outros fatores, como as

condições ambientais e a natureza do substrato, corroboram no nível de expressão (RHAMAM et al., 2004).

1.3.11 Leveduras

As leveduras são micro-organismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao reino Fungi. Como características morfológicas apresentam parede celular, esféricas ou ovais, nutrição heterotrófica através de absorção dos nutrientes, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, e ausência de motilidade, entre outras. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão, não serem filamentosas e não formarem corpos de frutificação (KURTZMAN e FELL, 1998).

São micro-organismos capazes de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, podendo utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como fonte de carbono, o que os torna capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais. Na ausência de oxigênio as leveduras fermentam os carboidratos e produzem etanol e dióxido de carbono, sendo úteis em processos industriais principalmente na área de alimentos (AIDOO et al., 2006; MORENO-ARRIBAS e POLO, 2005).

Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono para seu crescimento e obtenção de energia necessária a manutenção de suas funções vitais e nitrogênio, oxigênio e o carbono obtido pode ser na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, em alguns casos durante o desenvolvimento de processos de biorremediação hidrocarbonetos variados e minerais (TORTORA et al., 2002).

A importância industrial das leveduras vem aumentando em diversidade pois, além da fermentação tradicional pelo que são responsáveis ao fornecerem a maior quantidade disponível de produtos fermentados em todo mundo. Atualmente, os produtos biotecnológicos a partir de leveduras estão presentes em muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, de bebidas, biocombustíveis, nos produtos químicos, nas enzimas industriais, nos produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o no meio ambiente (biorremediação) (PRETORIUS et al., 2003).

1.3.12 *Candida lipolytica* (*Yarrowia lipolytica*)

É um micro organismo do tipo leveduriforme, estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica*, pertencente ao grupo das leveduras não convencionais, em relação à fisiologia, genética e a biologia molecular é, portanto, a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Como não é considerada patogênica, é aplicada na geração de produtos com baixo custo, mas com grande interesse industrial como na produção de proteínas específicas de micro-organismos unicelulares, aroma de pêsego e ácido cítrico, (TSUGAWA et al., 1969). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lípases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD et al., 2002). Recentemente, a seqüência total dos seis cromossomos de *C. lipolytica* foi determinada, permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma. Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para pesquisa básica e também para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas (DUJON et al., 2004),

A *Candida lipolytica* tem como habitat, substratos ricos em lipídios e proteínas (laticínios, microbiota de queijos picantes, produtos avícolas crus), mas a grande maioria das cepas foi isolada do solo, de rede de tratamento de esgoto e de ambientes marinhos contaminados com óleos (ISMAIL et al., 2001; HAEGLER e MENDONÇA- HARGLER, 1981).

Apresenta vigoroso crescimento em diferentes variações de pH. Embora o pH seja um fator que influencie fortemente na morfologia das suas células, alterações nutritivas do meio, como fonte de nitrogênio orgânico, associadas a variações de pH sugerem uma maior resposta a modificações morfológicas celulares da *C. lipolytica* do que apenas o pH isoladamente (SZABO E STOFANÍKIVÁ, 2002). Apesar de ter crescimento ótimo a 30°C, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 °C a 32°C (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Foi comprovado que aplicação de estresse térmico, com temperaturas variando entre 29 °C e 37 °C e oxidativo, por peróxido de hidrogênio, com concentração de até 1M, durante o cultivo de *C. lipolytica* favoreceu de forma significativa, maior crescimento na forma de hifas (KAWASSE et al., 2003).

Algumas espécies de leveduras exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas, esse fenômeno atrai muita atenção devido à possibilidade de sua ligação à virulência de vários fungos patogênicos importantes, a caracterização das condições que regulam a morfogênese e diferenciação das células pode levar a importantes descobertas de novos remédios ou tratamentos efetivos contra outras leveduras patogênicas (SZABO e ŠTOFANÍKOVÁ, 2002). A *Candida lipolytica* apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH e GAILLARDIN, 1997). É utilizada como modelo devido a sua susceptibilidade à manipulação genética e apresenta fácil distinção entre as formas morfológicas (JIMÉNEZ-BREMONT et al., 2001).

Durante o processo de fermentação a *Candida lipolytica* produz agentes emulsificantes, capazes de estabilizar emulsões água-óleo. O bioemulsionante Liposan produzido é composto aproximadamente de 83% de carboidrato e 17% de proteína, apresentando atividade emulsionante comprovadamente maior que alguns emulsionantes comerciais como: goma arábica, alginato e caseína (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984; CIRIGLIANO e CARMAN, 1985).

A assimilação dos substratos hidrofóbicos pode ocorrer pela adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pela mediação de um surfactante. Na adsorção direta, diversos mecanismos podem estar envolvidos como: interações hidrofóbicas, interações de Lewis (base ou ácido), interações eletrostáticas (ou Van der waals) (AGUEDO et al., 2003). Os surfactantes apresentam influência significativa nas propriedades da superfície das células da *Candida lipolytica* obtendo assim resultados controversos como; o aumento da hidrofobicidade após a adição do Tween 80 e a redução do percentual de adesão ao decano pela adição de Saponina e Triton X-100 (AGUEDO et al., 2004).

A *Candida lipolytica* é responsável pela produção da enzima lípase; extracelular e outras duas enzimas ligadas à célula (OTA et al., 1982), que atuam na liberação de ácidos graxos (ácido oléico C18:1, ácido linolênico C18:2, esteárico C18:0, margárico C17:0 ou heptadecanoico C17:1) essa variabilidade é demonstrada pela diversidade do padrão lipolítico da cepa. Os parâmetros que influenciam a produção da lípase e outras enzimas pela *Candida lipolytica* são: a composição do meio de cultura (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, presença de indutores), condições de temperatura, pH, e o tipo de processo (fermentação em meio sólido ou submerso), aeração e agitação (GUERZONI et al., 2001).

Vários grupos de pesquisa utilizam a *Candida lipolytica* como modelo alternativo de levedura para o desenvolvimento de ferramentas moleculares e genéticas, além de estudarem sua

elevada capacidade de expressar e secretar proteínas. Nos laboratórios da Gaillardin (França), Ogyrdgiak e Pfizer Inc (EUA) foi sugerido que a *Candida lipolytica* poderia ser um hospedeiro alternativo para produção de proteínas heterológicas devido a sua capacidade de crescer em ácido oléico. Grupos de pesquisa do Canadá têm utilizado a *Candida lipolytica* para o desenvolvimento de análises em genes envolvidos na biogênese de peroxissomos, junto a grupos de Nicaud (França), Barth e Sibirny (Alemanha e Ucrânia) Mauersberg (Alemanha) realizaram ainda análises genéticas sobre a via de degradação dos hidrocarbonetos e a produção de lactona melhorada (CASAREGOLA et al., 1997).

No início do ano 2000 grupos internacionais uniram seus esforços para concluir o seqüenciamento do genoma da *Candida lipolytica*, mapeamento e construção de uma biblioteca BAC (CASAREGOLA et al., 2000). Sendo lançada uma parcial sobre o seqüenciamento do genoma da cepa W29, também recentemente a seqüência completa do genoma da cepa E150 (CLIB99) foi determinada pela Ge' molecular Consortium; comunidade de pesquisadores com base em vários laboratórios franceses assistidos por uma rede informal de parceiros internacionais (DUJON et al., 2004; SHERMAN et al., 2004).

1.4 Referências Bibliográficas

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

AGUEDO, M., WACHÉ, Y., COSTE, F. e BELIN. HUSSON, F. e BELIN. J-M. Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29 (1-6), p. 31-36, 2004.

AIDOO, K. E., NOUT, R. M. J. and SARKAR, P. K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS(Federation of European Microbiological Societies)Yeast Research**, v.6, p.30–39, 2006.

AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzol [a] pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**, v. 65, p.666- 673, 2006.

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

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

AMASS, A. J. Metathesis Polymerization Chemistry In: GC Eastmond, A. Ledwith, S. Russo, P. Sigwalt, eds., **Comprehensive Polymer Science**, v.4, p.109-134, Pergamon Press, Oxford, 1989.

ANDERSON, C.M., LABELLE, R.P. Update of comparative occurrence rates for offshore oil spills. **Spill Science and Technology Bulletin**, v.6, n.5/6, p.303-321, 2000.

ANP - **Agência Nacional do Petróleo** - Portaria N° 137, de 1° de Agosto de 2000.

ATLAS, R. M. Biorremediation: research expands range of organisms used to clean up pollution. **Chemical & Engineering News** 3: 1-32, 1995.

ATLAS, R.M. Pathways of microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective. **Microbiology Review** ,v.45, p.180-209, 1984.

ATLAS, R.M.; R. BARTHA. **Microbial Ecology: Fundamentals and Application**. 2^a Ed., Menlo Park : The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., USA., 533p, 1987.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 edição, Porto Alegre:Ed. Bookman, 2002.

BAKER, K. H., HERSON, D. S. Introduction and overview of bioremediation. In: BAKER, K.H. and HERSON, D.S. **Bioremediation**. New York: McGraw-Hill, p.1-7, 1994.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, p. 495-508, 2000.

BANJOO, D.R., NELSON, P.K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography**. 1066: 9-18, 2005.

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

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

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.

BENTO, F.M. ; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.96, n.9, p.1049-1055, 2005.

BERNABEI, M.; REDA, R.; GALIERO, R.; BOCCHINFUSO, G.: Determination of total and Polycyclic aromatic hydrocarbons in aviation jet fuels. **Journal of Chromatography A**. v. 985, p.197-203. 2003.

BLANC, P.; CONNAN, J. Preservation, Degradation, and Destruction of Trapped Oil. In: Magoon, L.B. and Dow, W.G., eds. The Petroleum System-From Source to Trap: AAPG Memoir, 60, p. 237-250,1994.

BODKIN, J. L.; BALLACHEY, B. E.; DEAN, T. A.; FUKUYAMA, A. K.; JEWETT, S.C.; McDONALD, L.; MONSON, D. H.; O'CLAIR, C. E.; VANBLARICOM, G. R.. Sea otter population status and the process of recovery from the 1989 'Exxon Valdez' oil spill. **Marine Ecology Progress Series**, v. 241: 237- 253, 2002.

BOGNOLO, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and surfaces A: **Physicochemical Engineering Aspects**. v.152, p.41-52,1999.

BRAGA, A. C; REIS, A. M .M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, 7:53-56, 2007.

BRAGA, B; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L; BARROS, M. L; SPENCER, M.; PORTO, M; NUCCI, N; JULIANO, N; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, p.305, 2002.

BRAGA, T. M.; MIKAILOVA, I.; GUERRA, C. B.; RAVSKI, F. D. **Grandes indústrias e impacto ambiental: análise empírica e métodos de mensuração aplicados às indústrias da bacia do Piracicaba (MG)**. 2003. 25p. Texto para discussão ((Faculdade de Ciências Econômicas)) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

CAMEOTRA, S. S.; BOLLAG, J. M. Biosurfactant Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 111-126, 2003.

CASAREGOLA, S., FEYNEROL, C., DIEZ, M., FOURNIER, P. and GAILLARDIN, C. Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Chromosoma**, v.106, p.380–390, 1997.

CASAREGOLA, S.; NEUVE'GLISE, C.; LEPINGLE, A.; BON, E.; FEYNEROL, C.; ARTIGUENAYE, F.; WINCKER, P.; GAILLARDIN, C. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. **FEBS Letter** v.487, p.95–100, 2000.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D.T. & VAN BAALEN, C. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quuduplicatum*, strain PR-6. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.88, p.50-58, 1979.

CERNIGLIA, C.E. & GIBSON, D.T.. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.363- 370, 1977.

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

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

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

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, Editora: Unicamp, 2006.

COOKSON, T. **Biodegradation Engineering: Design and Application**. McGraw- Hill Inc, 525p, 1995.

COONEY, J. J. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. p.399-434. In: R. M. Atlas (ed.), **Petroleum microbiology**. Macmillan Publishing Co.:New York, 1984.

CRAPEZ, M. A. C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na microbiota marinha. *In: Efeitos dos poluentes em organismos marinhos*. R. Moraes *et al* (Eds). **Arte e Ciência – Vilipress**, p. 253-267, 2001.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v.30, p.129, 2002.

DEAN, S.M.; JIN, Y.; CHA, D.K.; WILSON, S.W.; RADOSEVICH, M. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. **Journal of Environmental Quality**, v.30, p. 1126-1133, 2001.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes rendus Chimie**, v.7, p.641-646, 2004.

DESAI, J.D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J.; Production of Biosurfactants. In : Kosaric N (ed). Biosurfactants: production, properties, applications. **Surfactants Science Series..**, New York, **Marcel Dekker Inc.**, v. 48, p.65-97,1993.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I., De MONTIGNY, J., MARCK, C. NEUVE'GLISE, C., TALLA, E., GOFFARD, N., FRANGEUL, L., AIGLEI, M., ANTHOUARD, V., BABOUR, A., BARBE, V., BARNAY, S., BLANCHINI, S., BECKERICH, J.M., BEYNE, E., BLEYKASTENI, C., BOISRAME, A., Boyer, J., CATTOLICO, L., CONFANIOLERI, F., De DARUVAR, A., DESPONS, L., Fabre, E., FAIRHEAD, C., FERRY-DUMAZET, H., GROUPI, A., HANTRAVE, F., HENNEQUIN, R., JAUNIAUX, N., JOVET, P., KACHOURI, R., KERREST, A., KOSZUL, R., LEMAIRE, M., LESUR, I., MA, L., MULLER, H., NICAUD, J.M., NIKOLSKI, M., OZTAS, S., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., PELLEZ, S., POTIER, S., RICHARD, G.F., STRAUB, M.L., SULEAU, A., SWENNEN, D., TEKAIA, F., WESOLOWSK-LOUVEL, M., WESTHOF, E., WIRTH, B., ZENIOU-MEYER, M., ZIVANOVIC, I., BOLOTIN-FUKUHARA, M., THIERRY, A., BOUCHIER, C., CAUDRON, B., SCARPELLI, C., GAILLARDIN, C., WEISSENBAACH, J., WINCKER, P. and SOUCIET, J.L. **Genome evolution in yeasts**. *Nature* 430, 35–44, 2004.

FANG, J.; BARCELONA, M. J.; Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Chemosphere**, v.50, p. 105-109. 2003.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v.609, p.81- 91, 2006.

FRIOLEIFSDOTTIR, S.; MATHIESEN, A.M.; ASGRIMSSON, H. Iceland's Policy. **The Ocean**, p.1-44, 2004.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65. 1992.

GERSON, D.F. The biophysics of microbial surfactants: Growth on insoluble substrates, p.269-286. In : Biosurfactants: Production, Properties, Applications ed. N.Kosaric, New York: Marcel Dekker, 1993.

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

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**. v.23 n.1, p. 235-239. 2000.

GUERZONI, M. E., R. LANCIOTTI, and P. S. COCCONCELLI. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiology** 147:2255–2264, 2001.

HAEGLER, A. N. e MENDONÇA-HAEGLER, L. C. "Yeast from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil", **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.1, pp.173-178, 1981.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, v.169, p.1-15, 2009.

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

HOMMEL, R. K.; HUSE, K.; Regulation of sophorose lipid production by *Candida apicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 8, p. 853-858, 1993.

IRWIN, R. J., VANMOUWERICK; STEVENS, L.; SEESE, M. D.; BASHAM, W.: Jet Fuel 'A' Entry" *In Environmental Contaminants Encyclopedia*. Colorado. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins. 1999.

IRWIN, R. J.; Van MOUWERIK, M., STEVENS, L., SEESE, M. D., BASHAM, W. **Environmental Contaminants Encyclopedia**. Kerosene Entry. National Park Service, Water Resources Division, Water Operating Branch. Oakridge Drive, Suite Fort Collins, Colorado 80525, 1997.

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

JABLONSKI, S. Mar-Oceanografia/Biologia Pesqueira. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Brasil, Ministério de Ciências e Tecnologia. 25p,2003.

JIMÉNEZ-BREMONT , J.F., RUIZ-HERRERA, J. e DOMINGUEZ, A. "Disruption of gene YIODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*", **FEMS Yeast Research**, v.1, pp.195-204, 2001.

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

KANIKKANNAN, N.; LOCKE, B. R.; SINGH, M.: Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). **Toxicology**. v.161, p.1-11. 2001.

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

KENNEDY, V.S.; TWILLEY, R.R.; KLEYPAS, J.A.; COWAN, J.H.; HARE, S.F. Coastal and marine ecosystems and global climatic changes. Potential effects on U.S. resources. **Environment**, p.1-52, 2002.

KING, R. B, LONG, G. M & SHELDON, J. K . Practical environmental bioremediation, the field guide. **Lewis Publishers**, NY. 1997.

KING, R.O. Deepwater Horizon Oil Spill Disaster: Risk, Recovery, and Insurance Implications. **Congressional Research Service**, p. 1- 21, 2010.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. eds. The Yeasts: A Taxonomic Study, 4^a ed. Amsterdam:Elsevier, 1998.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; MAKAROV, S.O.; LITVINENKO, L.V; CUNNINGHAM, C'J.; PHILP, J.C. Effect of biosurfactant on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environ. Int.** 31: 155-161, 2005.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiology Review**, v.54, n.3, p.305-315, 1990.

LEE K.; LEVY M. Biodegradation of Petroleum in the Marine Environment and its Enhancement. *Advance Environmental Science and Technology*. 22. 217-43. 1988.

LEE, M. L.; NOVOTNY, M. V.; BARTLE, K. D.; Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds, **Academic Press**: New York, 1981.

LITERATHY, P. Considerations for the Assessment of Environmental Consequences of the 1991 Gulf War. **Mar. Pollut. Bull.** 27. 349-356, 1993.

LITERATHY, P.; HALDER,S.; SAMHAN,O.; MOREL,G. Experimental Studies on Biological and Chemical Oxidation of Dispersed Oil in Seawater. *Water Science and Technology*, v. 21, p.845-856, 1989.

MACGILLIVARY, A.R. and SHIARIS, M.P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. ***Applied and Environmental Microbiology***, v.59, p. 1613-1618,1993.

MAIER R. M.; SOBERON-CHAVEZ G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids:biosynthesis and potential applications. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 54, p.625–633, 2000.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biochemical na Structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. ***Journal of Surfactants and Detergents***. v. 2, p. 371-376, 1999.

MAKKAR, R.S.;CAMEOTRA, S.S. An updote on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. v.58, p.428-434, 2002.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado em Geociências e Ciências Exatas), UNESP. Rio Claro, 147 p., 2006.

MARIANO, J.B. **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo**, Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético.) COPPE /UFRJ, Rio de Janeiro, 216p., 2001.

MIRLEAN, N.; NIENCHESKI, L. F.; BESNICK, B.; BAUMGARTEN, M. G. The Effect of Accidental Sulfuric Acid Leaking on Metal Distributions in Estuarine Sediment of Patos Lagoon. ***Marine Pollution Bulletin***. v.42, n.11, p. 1114-1117, 2001.

MOL, J.C. Metathesis of unsaturated fatty acid esters and fatty oils. *Journal of Molecular Catalysis*., v.90, p.185-199, 1994.

MORENO; CORSEUIL, 2001. Fitorremediação de aquíferos contaminados por gasolina. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.6, p.1-7, 2001.

MORENO-ARRIBAS M.V. & POLO M.C. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amsterdam, v. 45, p. 265-286, 2005.

MORGAN, P., and WATKINSON, R. J. Biodegradation of components of petroleum. In: C. Ratledge, ed. **Biochemistry of Microbial Degradation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-31, 1994.

MUKHERJEE, S.; PALASHPRYA, D.A.; RAMKRISHMA, S.E.N. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n.11, p. 509- 515, 2006.

MULLIGAN , C. N., YONG, R. N., GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology** 60, 371–380, 2001.

NICAUD, J.M., MADZAK, C., VAN DEN BROEK, P., GYSLER, C., DUBOC, P., NIEDERBERGER, P. and GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Res.** 2, 371–379, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25, p. 772-776, 2002.

NOCENTINI, M., PENILLI, D., PASQUALI, G., FAVA, F., PRANDI, A. Biotreatability and feasibility studies for a bioremediation process of a kerosene contaminated soil. In: Verachtert, H., Verstraete, W. (Eds.), **Proceedings of International Symposium on Environmental Biotechnology**, vol. 2. Technologisch Institut, Antwerpen, Belgium, p.07–310, 1997.

NOCENTINI, M., PENILLI, D., PASQUALI, G., FAVA, F., PRANDI, A. Biotreatability and feasibility tests for a bioremediation process: a case study for a kerosene contaminated soil. **Ann. Chim.-Rome**, v.88, p.177–187, 1998.

OU DOT, J. FUREY, P., ABDELOUARID, D.E., HALOUI, S. and ROQUEBERT, M.F., Capacities degradatives de bacteries et de champignons isolés d'un sol contamined par um fuel. **Canadian Journal of Microbiology** v.33, p. 232- 243, 1987.

PALEJWALA, S.; DESAI, J.D.; Production of an extracellular emulsifier by a Gram-negative bacterium. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 2, p. 115-118. 1989.

PASSOS, C.T.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKET, C.A.V. Biodegradação de fenol
PATEL, M.N.; GOPINATHAN, K.P.; **Applied Environmental and Biotechnology**, p.52-1224, 1986.
PAVITRAN, S.; JAGTAP, C.B.; SUBRAMANIAN, S.B.; TITUS, S.; PRADEEP-KUMAR, P.; DEB, P.C.
Microbial Bioremediation of Fuel Oil Hydrocarbons in Marine Environment. **Defence Science Journal** , v.56, n.2, p.209-224, 2006.

PRETORIUS, I. S.; TOIT, M. du; RENSBURG, P. VAN. "Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century." **Food Technol. Biotechnol.** v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003.

RAHMAN, K .S. M; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS. Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.
Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v.90, v.159–168, 2003.

RATLEDGE, C. e EVANS, C.T. (1989). "Lipids and their metabolism". In: The yeast – metabolism and physiology of yeasts. 2nd Ed. A.H. Rose and J.S. Harrison v.3 pp.367- 455 *apud* PEREIRA-MEIRELLES, F.V. (1997). "**Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica***", Dissertação (Doutorado em Ciências), IQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SABATE, J.; VINAS, M.; SOLANAS, A.M. Laboratory scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration Biodegradation.** v.54, p.19-25, 2004.

SANTOS, D.H.C. (2006) **Estudo Socioambiental dos Naufrágios da Plataforma Continental de Pernambuco - Brasil: Contribuição para Formulação de Políticas Ambientais e Manejo de Recifes Artificiais Marinhos na Costa do Estado de Pernambuco.** 2006. 152 p. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006.

SARAIVA, E. **Perspectiva da utilização da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nagelli* no tratamento de efluente da indústria de pescado**. 2003. 120p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2003.

SHERMAN, D., DURRENS, P., BEYNE, E., Nikolski, M. and Souciet, J.L. Ge'nolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. **Nucleic Acids Res.** 32, 315–318, 2004.

SILVA, P. R. **Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais**. 2004. 148p. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Ciências e Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SILVESTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5° Ed., Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 1994.

SINGH, M.; DESAI, J. D. Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.27, p.224-226, 1989.

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

SOUZA, F.A.S.D. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar**. Dissertação (Mestrado), 174p. UNICAP, Recife, 2009.

SUBRAMANIAN , A.N. (1998) . Chap1. Introduction: Marine Environment.p.24-31.

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

SZABO, R. e ŠTOFANÍKOVÁ, V. "Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formaton and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*", **FEMS Microbiol. Letters**, v.206, pp.45-50, 2002.

TISSOT, B. P. & WELTE, D. H. Petroleum formation and occurrence. Second revised and enlarged edition. **Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg**, New York, Tokyo, p.699, 1984.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6^a Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003.

TSUGAWA, R.; NAKASE, J., KOBAYASHI, I., YAMASHITA, K., OKUMURA, S. Fermentation of n-parafins by yeasts. I. Fermentative production of α -ketoglutaric acid by *Candida lipolytica*. **Agric Biol Chem** 33: 158±167, 1969.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T.; **Agri. Biol. Chem.** P.53-737, 1989.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments**. Reference methods for marine pollution studies, no 20, p. 97, 1991.

VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. Strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. **Applied Environmental Microbiology**. 67:4874-4879, 2001.

VANCE-HARROP, M.H. ; SARUBBO, L.A.; CARNEIRO DA CUNHA, M.G.; BUARQUE-GUSMÃO, N.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. 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.

VON MÜHLEN, C.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; MARRIOTT, P.J. Caracterização de Amostras Petroquímicas e Derivados Utilizando Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (Gcxgc). **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.765-775, 2006.

ZINJARDE, S.; CHINNATHAMBI, S.; LACHKE, A.H.; PANT, A. Isolation of an Emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a Modified Mini Isoelectric Focusing Unit. Lett. **Applied Microbiology**, v.24, p. 117-121,1997.

ZIOLLI, R. L; JARDIM, W. F. Operational problems related to the preparation of seawater soluble fraction of crude oil. **Journal Environmental Monitoring**, v.4, p.138-141, 2002.

CAPÍTULO 2

Biodegradação de querosene e produção de bioemulsificante/biossurfactante pela levedura halo-álcali-tolerante *Candida lipolytica* em água do mar

**J. F. da Silva¹, G.M.Campos-Takaki^{3,5}
e C.D.C.Albuquerque^{4,5}**

¹*Programa de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, PE, Brasil.*

³*Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE*

⁴*Curso de Ciência da Computação, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE*

⁵*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), UNICAP, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, Recife, PE, Brasil*

Autor para correspondência: Fone:+55-81-21194017 Fax:: +55-81-21194043
e-mail:cdaisy@unicap.br

*Manuscrito a ser submetido ao periódico Biodegradation

Resumo

A degradação de querosene e a produção de bioemulsificante/biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, foram investigadas. Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para avaliar os efeitos e interações do pH inicial (6, 10 e 14) e das concentrações das fontes de carbono (querosene a 10, 20 ou 30% v/v), nitrogênio (sulfato de amônio) e fósforo (fosfato monobásico de potássio) sobre a concentração da biomassa, a atividade de emulsificação e a tensão superficial dos líquidos metabólicos livres de células. Houve degradação de querosene em todos os ensaios do planejamento. Atividades de emulsificação superiores a 6 UAE foram obtidas. As salinidades finais dos meios de biodegradação foram maiores ou iguais a da água do mar. A maior concentração de biomassa (22,58 g/L) e a menor tensão superficial (25,04 mN/m) foram obtidas em ensaios com pH inicial 14, ratificando o comportamento halo-álcali-tolerante da levedura *C.lipolytica* UCP 0988.

Palavras-chaves: Biodegradação, Querosene, Água do Mar, *C.lipolytica*, Bioemulsificante, Biossurfactante.

1. Introdução

Com o uso crescente de petróleo e derivados (como óleo diesel e querosene) como fontes de energia e matéria prima por diversas indústrias, derramamentos de óleo tem se tornado uma constante ameaça para ambientes marinhos e costeiros (YANG et al., 1999).

Hidrocarbonetos de petróleo são os principais poluentes de ambientes marinhos, sendo proveniente de efluentes de refinarias costeiras, extração de petróleo, atividades de navegação e vazamentos acidentais. Embora a evaporação e foto-oxidação tenham um papel importante na descontaminação de óleo bruto, a degradação final e completa é realizada principalmente por micro-organismos (ATLAS, 1981; BARTHA, 1986).

Para controlar o risco ambiental causado por produtos de petróleo, várias novas regulamentações têm sido introduzidas e, ao mesmo tempo, pesquisas sobre biorremediação de solos e águas contaminadas por hidrocarbonetos têm sido incentivadas. Biorremediação envolve a aceleração de processos de biodegradação natural em ambientes contaminados. Ela usualmente consiste na aplicação de nitrogênio e fósforo, ajuste de pH e de teor de água e é frequentemente acompanhada pela adição de micro-organismos. Por outro lado, quando os poluentes têm uma baixa solubilidade em água, a adição de bioemulsificantes e biosurfactantes aumenta a taxa de biodegradação pelo aumento da disponibilidade do poluente (CALVO et al., 2009).

Considerável informação sobre degradação microbiana de determinados hidrocarbonetos está disponível na literatura, mas pouco se sabe sobre a biodegradabilidade de alguns produtos comerciais derivados do petróleo, como o querosene (WONGSA et al., 2004; SHABIR et al., 2008). Variedades de *Candida* incluindo diversas pertencentes a *C.maltosa*, *C. tropicalis* e *C.utilis* tem sido relatadas ter a habilidade de crescer sobre óleo bruto e alcanos (SUTHERLAND, 2004). Este gênero é bem conhecido como contaminante de querosene de aviação. Recentemente, duas variedades (IMI 395605 e IMI 395606), pertencentes a nova espécie *Candida kerosenea*, foram isoladas de amostras de querosene de aviação, caracterizadas e descritas com referência ao seu potencial como contaminante de querosene de avião, por Buddie et al (2010). Alguns

relatos tem se referido a *C. lipolytica* que, com base na sua produção de ascósporos, foi transferida para o gênero monotípico *Yarrowia* como *Y. lipolytica* (BUDDIE et al, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação de querosene e a produção de bioemulsificantes/biossurfactantes (BE/BS) por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

2. Materiais e Métodos

Micro-organismo e Meio de Preservação

A levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 foi obtida da coleção do banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. As colônias de leveduras foram mantidas em 4° C, em tubos de ensaio com o meio YMA (*Yeast Mold Agar*) inclinado, contendo 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de D-glicose, 5 g/L de triptona e 15 g/L de Agar. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl. Transferências usando técnicas assépticas foram realizadas mensalmente para placas com agar para assegurar a viabilidade celular.

Querosene

Como fonte de carbono foi utilizado querosene A4, comercializado em Posto Petrobrás e supermercados para iluminação. O querosene A4 caracteriza-se por possuir hidrocarbonetos parafínicos (70%), aromáticos (20%) e olefínicos (5%) (FISPQ 006, 1997).

Água do Mar

A água do mar usada nos meios de produção foi coletada em garrafas de polietileno com capacidade de 2000 mL, em praia próxima à Refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, Pernambuco, em junho de 2008, e após filtração para retirada de sólidos em suspensão, apresentou salinidade igual a 37‰, gravidade específica igual a 1026 kg

m⁻³, pH igual a 8,22 e tensão superficial igual a 53,43 mN/m. A caracterização físico-química da água coletada foi realizada no Laboratório de Análises Minerais, Solos e Água do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco e está especificada na Tabela 1.

Determinação de Salinidade

As salinidades e gravidades específicas da água do mar e dos cultivos livres de células foram determinadas através de refratômetro de mão sem compensação automática de temperatura, escala entre 0 e 100‰ (ppt) de salinidade e 1000 a 1070 de gravidade específica, resolução 0,7‰. Uma amostra de água do mar estéril filtrada (tomada da superfície com auxílio de uma micropipeta) foi colocada sobre o prato do refratômetro, que foi mantido contra a luz. A leitura da salinidade em parte por mil e da gravidade específica foi realizada através do visor do refratômetro (ALBUQUERQUE, 2006).

Determinação da Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada pelo método do anel de *Du Noy* (ASTM D971, 1999) utilizando tensiômetro digital SIGMA 70 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland) na temperatura ambiente (25°C). A medida da tensão superficial (mN/m) foi realizada através do registro da força requerida para empurrar o anel de platina no líquido metabólico livre de células, através da interface ar-líquido (SINGH e CAMEOTRA, 2004),

Determinação de Atividade de Emulsificação

A atividade de emulsificação para emulsão água-em-hexadecano foi determinada de acordo com o método descrito por Cirigliano e Carman (1984). As amostras coletadas durante o crescimento dos micro-organismos foram filtradas através de membrana Milipore® (diâmetro do poro de 0,22 µm). Alíquotas de 2mL do filtrado livre de células

foram transferidas para tubos de ensaio (15x125 mm) com tampa e diluídas com 2 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3,0). A seguir, foi adicionado 1mL de n-hexadecano e a mistura, após fechamento do tubo de ensaio, foi submetida à agitação máxima, durante 2 minutos a 25° C, em agitador de tubos (vórtex). A emulsão uniforme resultante foi colocada em repouso por 10 minutos. Após este período, a absorbância foi medida, sendo o meio de cultivo utilizado como branco. O método define uma unidade de emulsificação como a quantidade de emulsificante que produzirá uma emulsão com absorbância de 1,0 em 540nm, ou seja, a quantidade de emulsificante capaz de elevar a absorbância do sistema em uma unidade.

Ensaio de Biodegradação de Querosene e Produção de BE/BS por Candida lipolytica *UCP 0988*

Planejamento Fatorial Completo 2⁴

A produção de BE/BS por *Candida lipolytica* foi realizada em água do mar natural, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, usando querosene como única fonte de carbono. Um planejamento fatorial completo 2⁴ foi realizado para verificar os efeitos e interações do pH inicial dos meios, das concentrações da fonte de carbono (querosene), da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) e da fonte de fósforo (fosfato monobásico de potássio) sobre o crescimento celular, o rendimento da biodegradação, a tensão superficial e a atividade de emulsificação de BE/BS produzidos por *Candida lipolytica*. Os intervalos e níveis dos componentes (fatores ou variáveis independentes) estudados estão apresentados na Tabela 2. Os intervalos foram especificados baseados em dados sobre biodegradação de óleo diesel em água do mar obtidos por Souza (2009) e em experimentos preliminares de biodegradação de querosene em água do mar realizado pela autora.

Um total de 20 experimentos foi realizado, incluindo 4 repetições no ponto central para obtenção de estimativa da variabilidade em função do erro experimental e para

permitir o teste de adequação do modelo de primeira ordem. Os experimentos foram realizados em ordem sorteada para evitar que erros atípicos fossem relacionados a determinadas combinações. Os componentes dos meios de produção foram dissolvidos em frascos de erlenmeyer de 1000 mL, contendo água do mar estéril, conforme as especificações do planejamento fatorial 2^4 (Tabela 1). O pH de cada meio também foi ajustado de acordo as especificações da Tabela 2. Os meios foram autoclavados a 120° C por 20 minutos.

A inoculação foi realizada, em câmara de fluxo laminar, na proporção de 5% do volume dos meios de produção, usando suspensão de 10^6 células de *Candida lipolytica* por mL de água do mar estéril. O volume útil dos meios de produção após a inoculação foi igual a 750 mL. A produção de BE/BS foi realizada durante 120 horas, com temperatura controlada em 28°C e com agitação de 200 rpm em shaker orbital.

3. Resultados e Discussão

Identificação dos melhores meios para produção de BS/BE por Candida lipolytica UCP 0988 em água do mar, tendo querosene como única fonte de carbono.

A matriz decodificada e os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^4 , realizado em escala de frascos, estão apresentados na Tabela 3. Os ensaios realizados mostram a capacidade de adaptação da levedura *C. lipolytica* em condições extremas de pH e salinidade. A levedura *C. lipolytica* foi capaz de usar querosene (a 10%, 20% ou 30% v/v) como único fonte de carbono e crescer em água do mar natural, suplementada com uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, produzindo biossurfactantes com altas atividades de emulsificação

No planejamento analisado, as concentrações iniciais de biomassa variaram entre 1,77 g/L (pH 6) e 22,58 g/L (pH 14). As concentrações médias da biomassa dos meios com pH 14, 10 e 6 foram respectivamente iguais a $13,27 \pm 7,04$ g/L, $3,48 \text{ g/L} \pm 1,09$ e $6,10 \pm 1,09$ g/L. As maiores concentrações de biomassa (22,58 e 22,18 g/L), ou seja, os

maiores percentuais de degradação de querosene pela levedura *C. lipolytica* ocorreram respectivamente, nos ensaios 2 (querosene 10%v/v) e 4 (querosene 30%v/v), realizados em pH 14 com concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio em seus níveis inferiores.

A tensão superficial média dos ensaios realizados no ponto central foi igual a $32,17 \pm 7,09$ mN/m. Entretanto, os ensaios que apresentaram as menores tensões superficiais, com percentuais de redução das tensões iniciais dos meios respectivamente iguais a 51,77; 60,42 e 45,41% foram os ensaios 6, 7 e 16. Por outro lado, os referidos ensaios apresentaram percentuais de redução das salinidades iniciais dos meios respectivamente iguais a 8,33; 20 e 10 %. Entre estes três ensaios, o ensaio 16 realizado com pH inicial 14 na maior concentração de querosene investigada (30% v/v) - foi considerado o melhor meio de produção de BS/BE por apresentar após 120 horas a menor tensão superficial e maiores atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e para emulsões óleo de motor-em água, na maior concentração salina final dos meios.

Efeitos do pH e das concentrações das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo sobre biomassa, a tensão superficial e as atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e emulsões óleo de motor-em água.

As Figuras 1, 2,3 e 4 apresentam diagramas de Pareto, com nível de confiança de 95%, para estimativas dos efeitos do pH, da concentração de sulfato de amônio e da concentração de fosfato monobásico de amônio sobre as variáveis resposta: (a) biomassa (b) tensão superficial do filtrado livre de células com 72 horas (c) atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e (d) atividade de emulsificação para emulsões-óleo de motor-em- água.

Conforme se pode observar na Figura 1, o pH foi um fator decisivo para biodegradação de querosene por *C.lipolytica* em água do mar, já que seu aumento de 6 para 14 exerceu um efeito positivo altamente significativo sobre o aumento da concentração de biomassa. Outro fator que favoreceu a biodegradação de querosene foi

aumento da concentração de sulfato de amônio. Por outro lado, o aumento da concentração de fosfato de potássio e as interações entre o pH e o fosfato, do querosene e o fosfato e entre o pH e o sulfato, nesta ordem, exerceram efeitos negativos sobre o aumento da concentração de biomassa. Os demais fatores e interações não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre o aumento da concentração da biomassa. O aumento da concentração inicial de querosene não influenciou com significância estatística o aumento da concentração de biomassa. Este resultado é também importante do ponto de vista da degradação de querosene, já que o mesmo foi a única fonte de carbono utilizada pela levedura.

De acordo com os resultados apresentados no Diagrama de Pareto, ilustrado a seguir, na Figura 2, nas condições estudadas, nenhuma das variáveis independentes investigadas nem as interações entre as mesmas exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a redução da tensão superficial.

Resultado similar ao anterior foi obtido em relação a variável resposta atividade de emulsificação para emulsões- água em óleo de milho. De acordo com os resultados apresentados e ilustrado na Figura 3. Nas condições estudadas, nenhuma das variáveis independentes nem as interações entre as mesmas exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho.

Por outro lado, conforme pode ser observado na Figura 4, o fosfato monobásico de potássio, a interação do pH com a concentração de querosene e a interação entre as concentrações de querosene e sulfato de amônio, nesta ordem, exerceram efeitos positivos estatisticamente muito significativos sobre a atividade de emulsificação para emulsões óleo-de- motor em água.

Apesar da permanente atualidade e importância crescente do tema e da existência na literatura de uma profusão de trabalhos sobre biodegradação de petróleo e derivados e produção de BE/BS, empregando os mais variados micro-organismos em diversas condições de cultivo, não existem trabalhos publicados sobre biodegradação de querosene e produção de BE/BS por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar, nas condições estudadas.

Entretanto, resultados obtidos sobre a influência positiva do sulfato de amônia e do fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação são corroborados por trabalhos citados na literatura, que relatam a produção de emulsificantes por *Candida lipolytica* em meio contendo água do mar diluída a 50%, usando óleo de babaçu (Vance-Harrop et al, 2003) e óleo de milho (Albuquerque et al, 2006) como fonte de carbono. Os referidos trabalhos também relatam a dependência das fontes de nitrogênio e do tampão fosfato para produção de bioemulsificante em meio à base de água do mar.

Em trabalho pioneiro sobre a produção de bioemulsificante em água do mar diluída a 50%, Vance Harrop (2000) obteve atividade de emulsificação para emulsão água-em-n-hexadecano de 2,555 UAE em líquidos metabólicos livres de células de *C. lipolytica* crescida em meio contendo 0,1 % (p/v) uréia; 0,1 % (p/v) de sulfato de amônia; 0,68 % (p/v) de fosfato de potássio, 5 % (v/v) de óleo de milho, 50%(v/v) de água destilada e 50 % (p/v) de água do mar.

Otimização de meio de produção de bioemulsificante por *C.lipolytica* em água do mar diluída foi realizada com sucesso por Albuquerque et al (2006). As autoras obtiveram atividade de emulsificação para emulsão água-em-n-hexadecano de 4,415 UAE e tensão superficial de 32,750 mN/m em meio de produção otimizado contendo 0,544 % (p/v) de uréia; 2,131 % (p/v) de sulfato de amônia; 2,628 % (p/v) de fosfato de potássio, 5% (v/v) de óleo de milho, 50 %(v/v) de água destilada e 50 % (v/v) de água do mar com pH inicial ajustado em 5,3.

Em processo de ampliação de escala de meio de produção otimizado em escala de frascos, Albuquerque (2006), obteve atividade de emulsificação para emulsão água-em-n-hexadecano de 5,46 UAE e tensão superficial de 33 mN/m com 120 horas de produção, em biorreator de 5 litros com volume útil de 4 litros, com temperatura controlada em 28°C , velocidade de agitação de 150 rpm e aeração de 1vvm, contendo 0,544 % (p/v) de uréia; 2,131 % (p/v) de sulfato de amônia; 2,628(p/v) de fosfato de potássio, 5% (v/v) de óleo de milho, 50 %(v/v) de água destilada e 50 % (v/v) de água do mar. Os resultados obtidos neste trabalho também mostram a habilidade da levedura *Candida lipolytica* produzir bioemulsificante quando crescida em condições de alta salinidade (água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo com salinidades variando 48‰ e 57‰).

Souza et al (2009) investigaram em escala de frascos, a produção de biossurfactantes/bioemulsificantes por *C. lipolytica* UCP 0998 em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando óleo diesel como substrato. Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para avaliar os efeitos e interações das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial dos cultivos livre de células de *C.lipolytica*. Altas atividades de emulsificação (superiores a 5,4UAE) foram obtidas em todos os ensaios. As interações entre as fontes de carbono orgânico (óleo diesel) e inorgânico (uréia) e o fosfato monobásico de potássio favoreceram com significância estatística o aumento da atividade de emulsificação dos meios. Nas condições estudadas não foi identificada correlação entre aumento de atividade de emulsificação e redução de tensão superficial.

4. Conclusão

A levedura *C. lipolytica* apresenta potencial de crescimento e produção de bioemulsificantes/biossurfactantes em água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando querosene como única fonte de carbono. Altas atividades de emulsificação e tensões superficiais reduzidas foram alcançadas em uma ampla faixa de valores de pH, merecendo destaque o pH 14. Novos planejamentos estão sendo delineados visando à otimização do processo em escala de frascos. Os dados experimentais gerados neste trabalho serão cadastrados em banco de dados biotecnológico para aplicações futuras em modelagem empírica usando técnicas convencionais e de computação bioinspirada (redes neurais, algoritmos genéticos, lógica fuzzy, sistemas imunológicos artificiais e inteligência coletiva).

Agradecimentos

A bolsista agradece a FACEPE pelo suporte financeiro.

5. Referências Bibliográficas

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

Albuquerque CDC, Fileti AMF, Campos-Takaki GM (2006) Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Canadian Journal of Microbiology** 52: 575-583.

Atlas RM (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews** 45:180–209.

ASTM D 971. 99^a (1999) Standard Test Method for Interfacial Tension of Oil Against Water by the Ring. In: Method American Society for Testing Materials. **West Conohocken**, Pennsylvania, USA.

Bartha R (1986) Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Microbial Ecology** 12:155–172.

Buddie AG, Bridge PD, Kelley J, Ryan MJ (2010) *Candida keroseneae* sp. nov., a novel contaminant of aviation kerosene. **Letters in Applied Microbiology** 52:70–75.

Calvo C, Manzanera M, Silva-Castro GA, Uad I, González-López J (2009) Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the total environmental** 407: 3634-3640.

Cirigliano MC, Carman GM (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 48:747-750.

Margesin R, Schinner F (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology** 56: 650–663.

Shabir G, Afzal M, Anwar F, Tahseen R, Khalid ZM (2008) Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation** 61:161–166.

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

Souza F.A.S.D, Salgueiro AA, Albuquerque CDC (2009) **Produção de Emulsificantes/Biosurfactantes por *Candida lipolytica* em Água do Mar usando Óleo Diesel como Fonte de Carbono.** In XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal.

Sutherland JB (2004) Degradation of hydrocarbons by yeasts and filamentous fungi. In: Arora DK (ed), Fungal Biotechnology in Agricultural, **Food, and Environmental Applications.** Marcel Dekker, New York, 443–455.

Vance-Harrop MH (2000) **Influência de fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biosurfactantes.** Recife, 2000. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

Vance-Harrop MH, et al (1999) Produção de biosurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho por *Candida lipolytica*. **Revista Symposium** 2:23-27.

Vance-Harrop MH, Buarque-Gusmão N, Campos-Takaki GM (2003) New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34:120-123.

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

Yang L, Lai C-H, Shieh WK (1999) Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. **Wat. Res.** 34: 3303-3314.

Tabela 1 Caracterização físico-química de água do mar*

Parâmetro Físico-químico	Valor
Condutividade elétrica a 20° C	49100,00
Dureza Total	6500,00
Cálcio (mg/L em Ca)	1002,00
Magnésio (mg/L em Mg)	972,80
Sódio (mg/L em Na)	11125,00
Potássio (mg/L em K)	875,00
Cloretos (mg/L em Cl)	20500,00
Sulfatos (mg/L em SO ₄)	3408,00

*Praia próxima a refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, em Pernambuco

Tabela 2. Níveis e valores dos fatores do planejamento fatorial completo 2^4

Fator	Nível		
	-1	0	+1
pH	6	10	14
Querosene (% v/v)	10	20	30
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0,10	0,60	1,1
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,68	1,36	2,04

Tabela 3 – Composições dos meios de produção e resultados, com 120h, de biomassa, atividade de emulsificação e tensão superficial dos ensaios do planejamento fatorial completo 2⁴, realizado em escala de frascos

Ensaio	Variáveis Independentes				Variáveis Respostas					
	pH inicial	Querosene (%v/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	pH final	Sal (‰)	Biomassa (g/L)	TS (mN/m)	AE1 (UAE)	AE2 (UAE)
1	6	10	0,10	0,68	5,62	40	1,77	32,43±0,2	3,796	5,186
2	14	10	0,10	0,68	12,34	30	22,58	33,62±0,29	3,396	2,346
3	6	30	0,10	0,68	5,62	40	2,73	28,90±0,2	3,894	1,876
4	14	30	0,10	0,68	12,42	40	22,16	40,01±0,36	3,572	1,404
5	6	10	1,1	0,68	6,15	40	5,84	31,60±0,16	3,802	4,876
6	14	10	1,1	0,68	12,95	55	14,09	25,79±0,01	1,29	0,886
7	6	30	1,1	0,68	5,97	40	15,96	26,45±0,43	3,978	1,554
8	14	30	1,1	0,68	11,95	40	17,96	39,35±0,27	6,0	6,0
9	6	10	0,10	2,04	5,55	45	4,42	37,76±0,22	6,0	6,0
10	14	10	0,10	2,04	11,36	40	7,05	33,00±0,79	6,0	6,0
11	6	30	0,10	2,04	5,55	45	2,05	35,98±0,08	6,0	6,0
12	14	30	0,10	2,04	11,96	45	5,41	38,03±0,76	6,0	6,0
13	6	10	1,1	2,04	5,59	45	14,11	35,76±0,14	6,0	6,0
14	14	10	1,1	2,04	12,29	45	10,89	33,73±0,77	1,336	6,0
15	6	30	1,1	2,04	6,08	45	1,89	46,92±0,19	6,0	6,0
16	14	30	1,1	2,04	11,70	45	6,03	25,04±0,2	6,0	6,0
17	10	20	0,6	1,36	9,26	35	1,96	24,34±0,49	2,14	4,986
19	10	20	0,6	1,36	7,94	40	3,57	41,30±0,36	2,344	6,0
20	10	20	0,6	1,36	9,45	40	3,85	33,15±0,56	6,0	6,0

Sal – Salinidade TS-Tensão Superficial AE-Atividade de Emulsificação: (1) Óleo de milho (2) Óleo motor

Legendas das Figuras

Figura 1- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e concentrações de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a concentração da biomassa com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical.

Figura 2- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e concentrações de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical.

Figura 3- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) pH e concentrações de (2) querosene, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho com 120 horas. O ponto, no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (em $p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical.

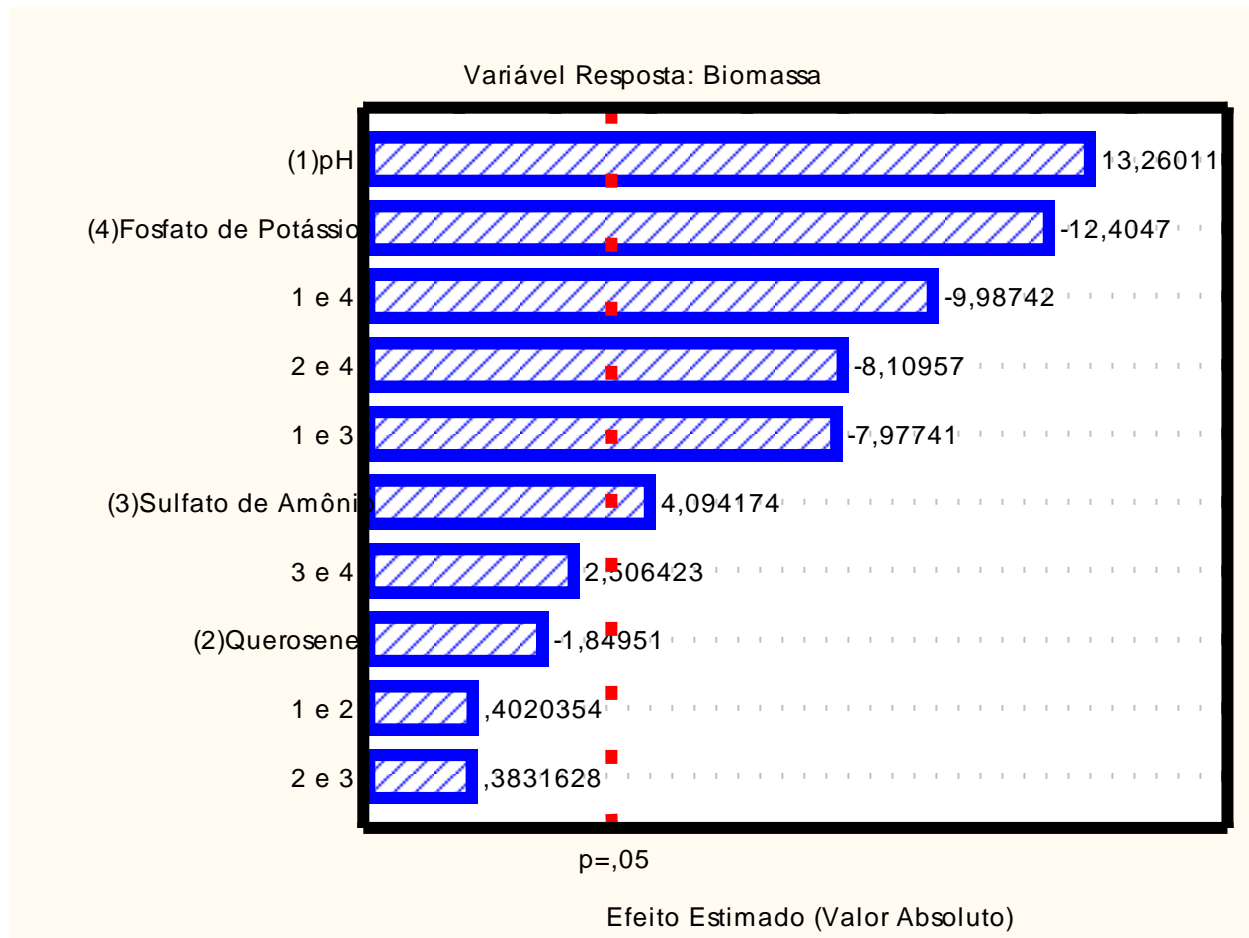


Fig. 1

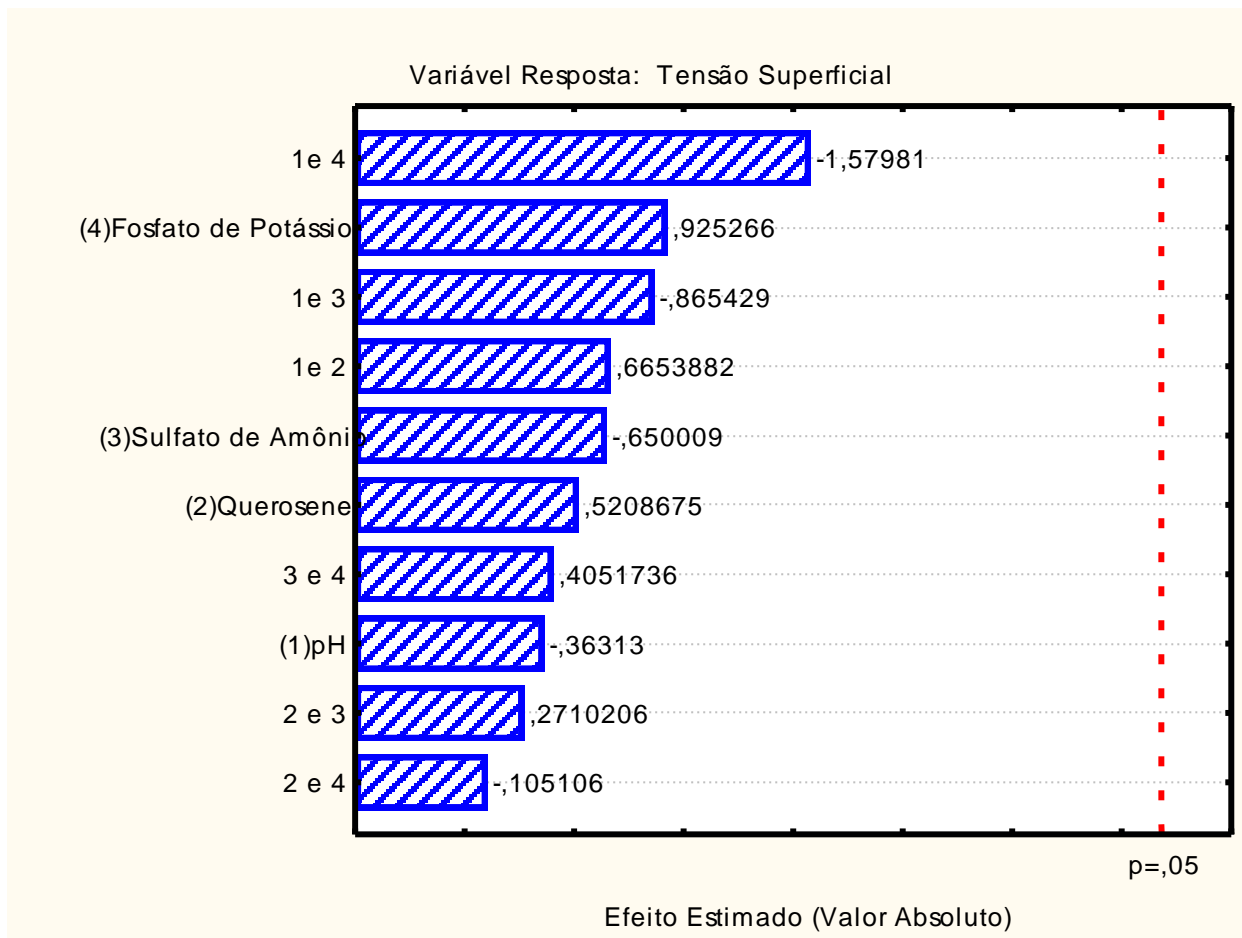


Fig. 2

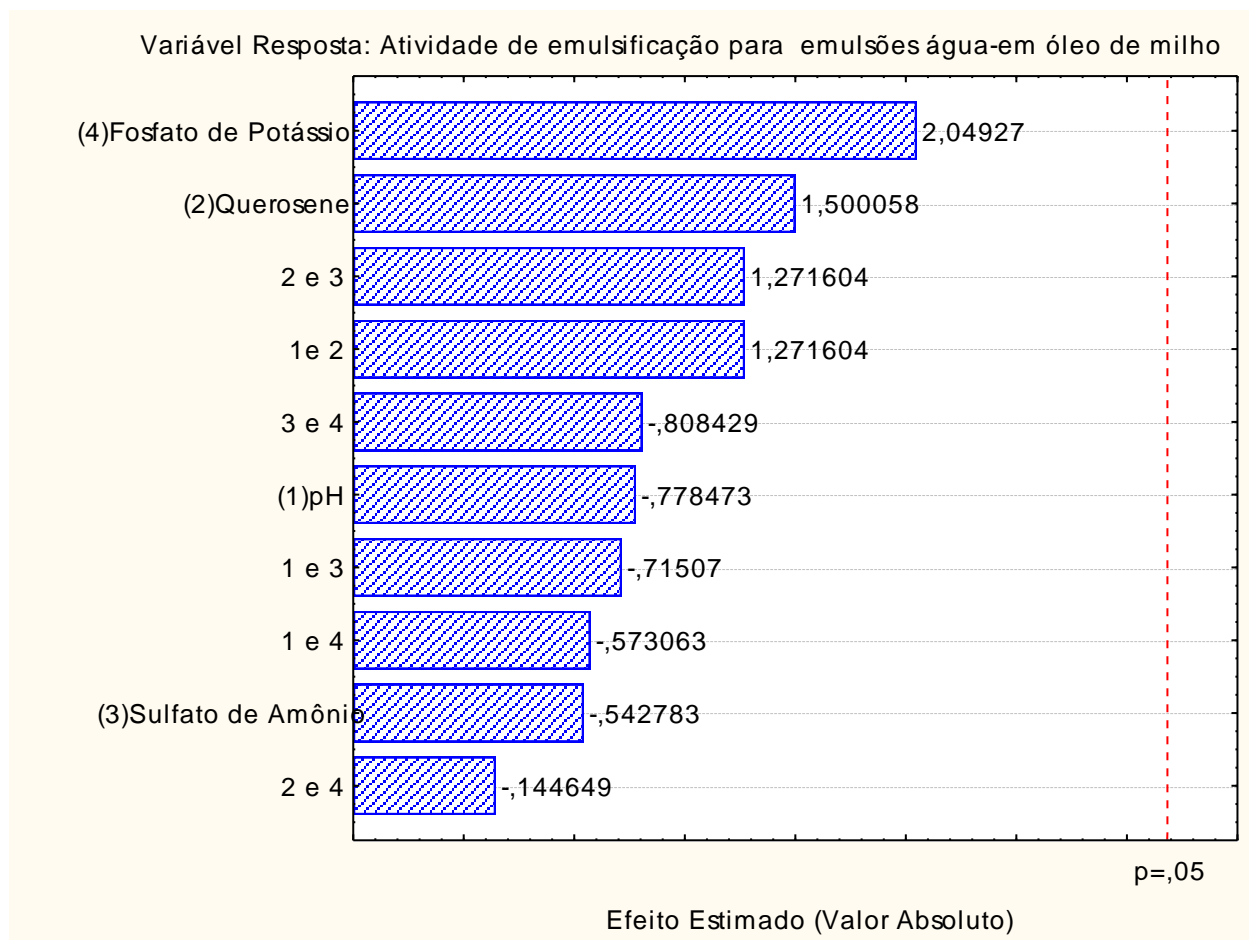


Fig. 3

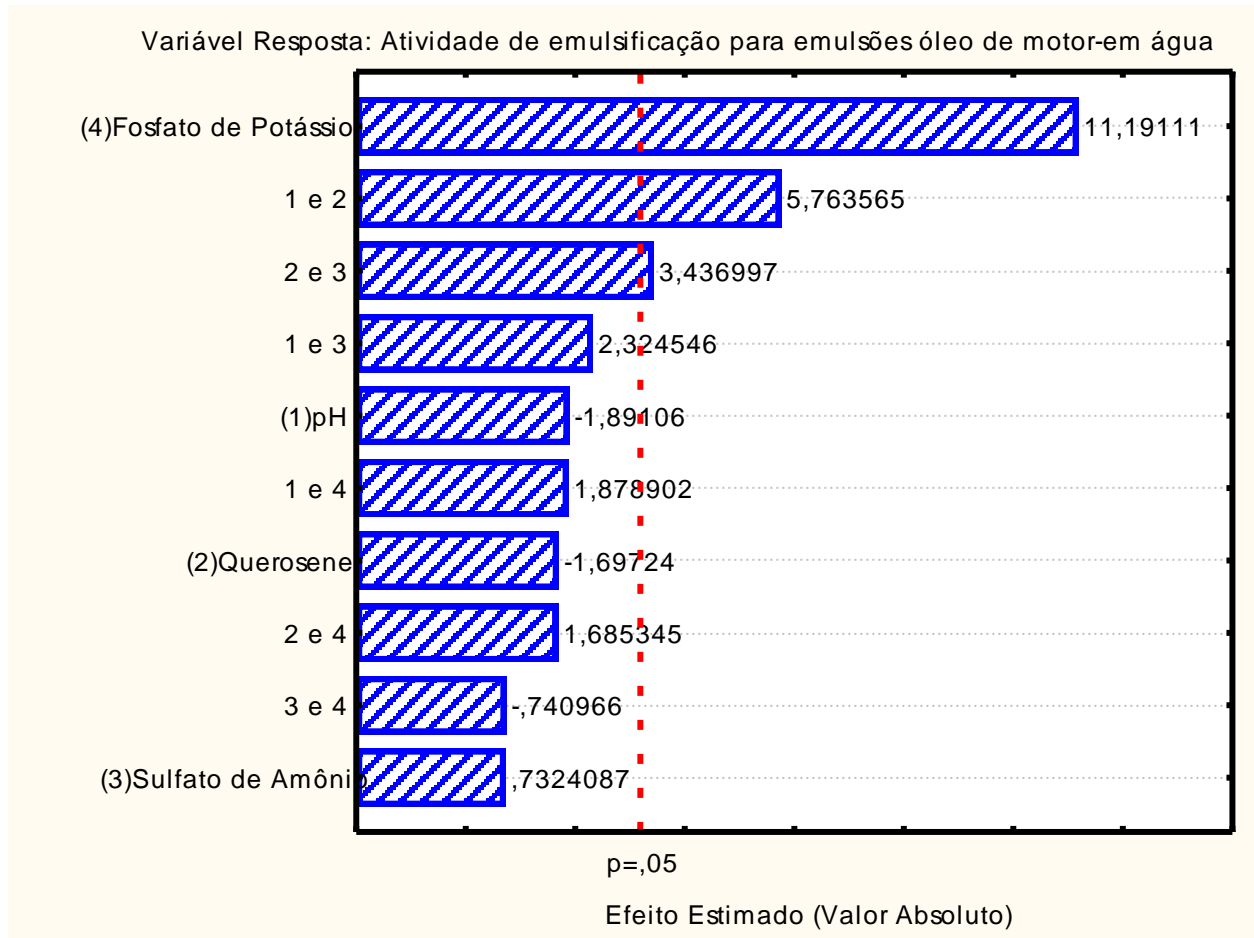


Fig. 4

Capítulo 3

Biodegradação de querosene e produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar em diferentes condições ambientais

**J. F. da Silva¹, G.M.Campos-Takaki^{3,5}
e C.D.C.Albuquerque^{4,5}**

¹*Programa de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, PE, Brasil.*

³*Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE*

⁴*Curso de Ciência da Computação, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE*

⁵*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), UNICAP, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, Recife, PE, Brasil*

Autor para correspondência: Fone:+55-81-21194017 Fax:: +55-81-21194043
e-mail:cdaisy@unicap.br

*Manuscrito a ser submetido ao periódico Bioresource Technology

Resumo

A habilidade da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 degradar querosene e produzir bioemulsificantes/biossurfactantes em água do mar natural, ácida ou alcalina, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, em condições de baixa oxigenação foi investigada. Planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para avaliar os efeitos do pH (6, 10 e 14) e das concentrações de querosene (10, 20 e 30%), sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração de biomassa, atividade de emulsificação e tensão superficial, pH e salinidades finais dos líquidos biodegradados livres de células. Os experimentos foram realizados a 28°C e 200 rpm em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL com volume útil de 750 mL. Querosene foi adicionado aos frascos após a inoculação criando um ambiente de oxigênio limitado. As concentrações médias da biomassa dos meios com pH 14, 10 e 6 foram respectivamente iguais a $13,43 \pm 4,19$ g/L, $15,28 \pm 0,63$ g/L e $9,58 \pm 7,51$ g/L. As concentrações de biomassa nos ensaios do planejamento variaram entre 0,72 e 23,20 g/L em pH 6 e entre 7,46 e 19,40 g/L em pH 14. As maiores concentrações de biomassa (23,20 e 19,40 g/L), ou seja, os maiores percentuais de degradação de querosene por *C. lipolytica* ocorreram respectivamente, em ensaio com pH inicial 6 e em ensaio com pH inicial 14. As tensões superficiais nestes dois ensaios foram respectivamente iguais a 37,13 mN/m e 39,6 mN/m. Altas atividades de emulsificação (6 UAE) foram obtidas para emulsões água-em-óleo de motor. A toxicidade do material residual biodegradado do ensaio que apresentou maior biodegradação de querosene não foi suficiente para inibir a germinação e o crescimento radicular de feijões macaçar (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.). Os resultados obtidos mostram a viabilidade tecnológica do processo de degradação de querosene por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar, ácida ou alcalina, suplementada por fontes de nitrogênio e fósforo e o potencial de aplicação industrial dos bioemulsificantes/biossurfactantes produzidos.

1. Introdução

A poluição de oceanos e mares por hidrocarbonetos tem crescido proporcionalmente ao aumento do consumo mundial de energia e do transporte marítimo de petróleo e derivados, entre eles o querosene. Os principais constituintes de querosene são alcanos e cicloalcanos (68,6%); benzeno e benzeno substituído (13,7%); e naftaleno e naftaleno substituído. Querosene possui de moderada a elevada toxicidade aguda para biota, com toxicidade específica do produto relacionada com o tipo e a concentração de compostos aromáticos (Song, Bartha 1990; Kalme et al 2008). A biodegradação de petróleo e derivados no ambiente é um processo complexo, cujo aspectos qualitativos e quantitativos dependerão da natureza e da quantidade do óleo ou hidrocarbonetos presentes, do ambiente e condições ambientais e sazonais, bem como da composição da comunidade microbiana autóctone (Leahy; Colwell 1990). Diversos fatores afetam a biodegradação de hidrocarbonetos. Exemplos típicos destes fatores limitantes são: composição química dos hidrocarbonetos de petróleo, estado físico, intemperismo, temperatura, nutrientes minerais, reações (pH baixos podem ser limitantes) e microorganismos, entre outros. Nutrientes são muito importantes para biodegradação bem sucedida de poluentes, especialmente nitrogênio, fósforo e em alguns casos ferro (Conney 1984). Dependendo da natureza do local impactado, alguns destes nutrientes podem tornar-se limitantes afetando assim os processos biodegradativos. De acordo com a literatura tanto culturas puras como culturas mistas podem ser usadas para biorremediação. Todavia, a maior taxa de degradação de hidrocarbonetos é frequentemente alcançada com um consórcio bacteriano enriquecido, isolado a partir do ambiente que necessita bioremediação (Juhász et al., 2000). Consórcios de bactérias exibem uma grande variedade de mecanismos metabólicos de fragmentação de hidrocarbonetos, incluindo produção de agentes tensioativos e emulsionantes (Willumsen e Karlson, 1997). Biossurfactantes podem afetar a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos de duas maneiras (Zhang, Miller 1992; Zhang, Miller 1995; Al-Tahhan et al 2000): pelo aumento da solubilização e dispersão do hidrocarbonetos e pela mudança de afinidade entre as células microbianas e os hidrocarbonetos por aumento de indução

na hidrofobicidade da superfície celular. Biodegradabilidade e baixo impacto ambiental são algumas das vantagens apresentadas por estes compostos em comparação com surfactantes sintéticos. No entanto, os custos de produção relacionados com a extração e com a purificação dos biossurfactantes são fatores limitantes que impedem sua produção em larga escala (Crosman et al 2002, Sadouk et al 2008). Este trabalho teve como objetivo investigar a degradação de querosene e produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *Candida lipolytica* em água do mar, ácida ou alcalina, com baixa oxigenação, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

2. Materiais e Métodos

Micro-organismo e Meio de Preservação

A levedura *Candida lipolytica* UCP 988 foi obtida da coleção do banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. As colônias de leveduras serão mantidas em 4° C, em tubos de ensaio com o meio YMA (*Yeast Mold Agar*) inclinado, contendo 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de D-glicose, 5 g/L de triptona e 15 g/L de agar. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl. Transferências usando técnicas assépticas foram realizadas mensalmente para placas com agar para assegurar a viabilidade celular.

Querosene

Como fonte de carbono foi utilizado querosene A4, comercializado em Posto Petrobrás e supermercados para iluminação. O querosene A4 caracteriza-se por possuir hidrocarbonetos parafínicos (70%), aromáticos (20%) e olefínicos (5%) (FISPQ 006, 1997).

Água do Mar

A água do mar usada nos meios de produção foi coletada em garrafas de polietileno com capacidade de 2000 mL, em praia próxima à Refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, Pernambuco, em março de 2011, e após filtração para retirada de sólidos em suspensão, apresentou salinidade igual a 43‰, gravidade específica igual a 1035 kg m⁻³, pH igual a 7,19 e tensão superficial igual a 49,6 mN/m. A caracterização físico-química da água coletada foi realizada no Laboratório de Análises Mineraias, Solos e Água do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco e está especificada na Tabela 1.

Determinação de Salinidade

As salinidades e gravidades específicas da água do mar e dos cultivos livres de células foram determinadas através de refratômetro de mão sem compensação automática de temperatura, escala entre 0 e 100‰ (ppt) de salinidade e 1000 a 1070 de gravidade específica, resolução 0,7‰. Uma amostra de água do mar estéril filtrada (tomada da superfície com auxílio de uma micropipeta) foi colocada sobre o prato do refratômetro, que foi mantido contra a luz. A leitura da salinidade em parte por mil e da gravidade específica foi realizada através do visor do refratômetro (Albuquerque, 2006).

Determinação da Tensão Superficial

A tensão superficial da água do mar e dos cultivos livres de células foram determinadas pelo método do anel de *Du Noy* (ASTM D971, 1999) utilizando tensiômetro digital SIGMA 70 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland) na temperatura ambiente (25°C). A medida da tensão superficial (mN/m) foi realizada através do registro da força requerida para empurrar o anel de platina no líquido metabólico livre de células, através da interface ar-líquido (Singh e Cameotra, 2004).

Determinação de Atividade de Emulsificação

A atividade de emulsificação para emulsão água-em-hexadecano foi determinada de acordo com o método descrito por Cirigliano e Carman (1984). As amostras coletadas durante o crescimento dos micro-organismos foram filtradas através de membrana Milipore® (diâmetro do poro de 0,22 μm). Alíquotas de 2mL do filtrado livre de células foram transferidas para tubos de ensaio (15x125 mm) com tampa e diluídas com 2 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3,0). A seguir, foi adicionado 1mL de n-hexadecano e a mistura, após fechamento do tubo de ensaio, foi submetida à agitação máxima, durante 2 minutos a 25° C, em agitador de tubos (vórtex). A emulsão uniforme resultante foi colocada em repouso por 10 minutos. Após este período, a absorbância foi medida, sendo o meio de cultivo utilizado como branco. O método define uma unidade de emulsificação como a quantidade de emulsificante que produzirá uma emulsão com absorbância de 1,0 em 540nm, ou seja, a quantidade de emulsificante capaz de elevar a absorbância do sistema em uma unidade. O mesmo método foi aplicado para determinação de atividades de emulsificação de emulsões água-em-óleo de milho, água-em-óleo diesel e água-em-óleo de motor, substituindo o n-hexadecano por óleo de milho, óleo diesel ou óleo de motor.

Determinação do Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubo de vidro de fundo reto com tampa rosqueável, 6 mL de n-hexadecano foram adicionados a 4 mL de líquido metabólico livre de células. O tubo foi agitado em vórtex máximo por 2 min. O índice de emulsificação (E %) foi determinado como a razão entre a altura da emulsão e a altura total, multiplicada por 100.

Planejamento Fatorial Completo 2⁴

Um planejamento fatorial completo 2⁴ foi realizado para verificar os efeitos e interações do pH inicial e das concentrações das fontes de carbono (querosene), nitrogênio (sulfato de amônio) e fósforo (fosfato monobásico de potássio) sobre a concentração de biomassa, a tensão superficial, as atividades de emulsificação e o pH e a salinidade finais dos meios de degradação de querosene e produção de bioemulsificante/biossurfactante por *Candida lipolytica*. Os intervalos e níveis dos variáveis independentes ou fatores estudados estão apresentados na Tabela 2 e basearam-se nos resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2⁴ apresentado no capítulo anterior. Os intervalos e níveis das variáveis pH e concentração de querosene foram mantidos. As concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio foram multiplicadas por 10 para avaliar os efeitos do aumento das concentrações dos nutrientes sobre o aumento da concentração de biomassa.

Um total de 20 experimentos foi realizado, incluindo 4 repetições no ponto central para obtenção de estimativa da variabilidade em função do erro experimental e para permitir o teste de adequação do modelo de primeira ordem. Os experimentos foram realizados em ordem sorteada para evitar que erros atípicos fossem relacionados a determinadas combinações. Os componentes dos meios de produção foram dissolvidos em frascos de erlenmeyer de 1000 mL, contendo água do mar estéril, conforme as especificações do planejamento fatorial 2⁴ (Tabela 2). O pH de cada meio também foi ajustado de acordo as especificações da Tabela 2.

A inoculação foi realizada, em câmara de fluxo laminar, na proporção de 5% do volume dos meios de produção, usando suspensão de 10⁶ células de *Candida lipolytica* por mL de água do mar estéril. O querosene foi adicionado aos frascos depois da inoculação da levedura criando um ambiente com oxigênio limitado. Não foram realizados ensaios de aclimação da levedura ao querosene. O volume útil dos meios de produção após a inoculação foi igual a 750 mL. Os ensaios de biodegradação de querosene e de

produção de bioemulsificante/ biosurfactante foram realizados durante 96 horas com a temperatura controlada em 28°C e a agitação em 200 rpm.

Determinação da Concentração da Biomassa

A determinação da concentração de biomassa foi realizada por gravimetria, através de filtração do meio de cultivo em membrana Millipore de 0,22 µm, secagem a 70° C até peso seco e pesagem em balança analítica (Albuquerque, 2006). O primeiro filtrado foi separado para determinação da atividade de emulsificação e da tensão superficial. A biomassa foi lavada com uma mistura formada por 5 ml de água destilada e 10 mL de metanol/clorofórmio na proporção 10:1 para extrair o óleo residual. O filtrado foi descartado e a biomassa foi lavada com a mistura até eliminar o querosene residual (Zhou e Kozaric, 1995).

Cinética de Crescimento Celular/Degradação de Querosene

Foi monitorada ao longo de 5 dias, a 28°C, em frascos agitados a 200 rpm para o ensaio do planejamento fatorial que apresentou maior degradação de querosene.

Controle da Biodegradação de Querosene em Água do Mar

O controle da biodegradação de querosene foi adaptado do protocolo para controle de biodegradação de hidrocarbonetos proposto por Blekinsopp et al (1996). Para o ensaio 3 - ensaio do planejamento fatorial que apresentou maior degradação de querosene (E3.1) foram realizados: controle positivo consistindo de água do mar, óleo de milho, nutrientes e inóculo (CP3.1); controle negativo consistindo de água do mar, querosene e inóculo (CN3.1) e controle estéril consistindo de água do mar, querosene e nutrientes (CE3.1). O controle positivo serviu como ponto de referência reproduzível para biodegradação sob condições ótimas (não tóxicas). O controle negativo serviu como ponto de referência reproduzível para biodegradação sob condições sub-ótimas (limitação de nutrientes). O

controle estéril serviu para medir perdas abióticas (i.e. volatilização adicional e perdas por dissolução). Controles positivo (CP3.2), negativo (CN3.2) e estéril (CE3.2) usando água destilada no lugar de água do mar, também foram realizados para monitoramento e controle do efeito salino sobre a biodegradação de querosene.

Teste de Fitotoxicidade

O teste de fitotoxicidade foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Tiquia et al. (1996), com algumas modificações. O efeito da toxicidade dos materiais residuais proveniente da biodegradação de querosene por *Candida lipolytica*, foi avaliado através do índice de germinação do feijão macaçar (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.). Foram empregadas placas de Petri esterilizadas, forradas com papel de filtro impregnado com 5 mL do líquido biodegradado e filtrado em membrana Millipore de 45 µm para eliminar células de leveduras e evitar contaminações e 10 feijões, colocados de forma equidistante, previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 1% e água destilada. Paralelamente foram empregadas placas controle contendo água destilada e água do mar estéreis, e placas contendo apenas o querosene. Todos os testes foram realizados em triplicata e mantidos sob a temperatura de 28°C, durante 7 dias. Após esse período, os percentuais de germinação e de crescimento das raízes e o índice de germinação foram calculados. A porcentagem de germinação foi calculada como a razão entre a média de sementes germinadas e a média de sementes germinadas no controle com água destilada, multiplicada por 100. A porcentagem do crescimento da raiz foi calculada como a razão entre a média do crescimento das raízes e a média do crescimento das raízes do controle com água destilada, multiplicado por 100. O índice de germinação foi calculado como o produto da porcentagem de germinação da semente, pela porcentagem de crescimento da raiz, dividido por 100.

Análises Estatísticas

As análises do planejamento fatorial completo, incluindo os diagramas de Pareto foram realizadas usando o programa Statistica® versão 8.0 (Statsoft.Inc, Tulsa/OK,USA). Os demais gráficos foram construídos com o apoio do programa SigmaPlot versão 10.0 (Systat software, Inc, Germany). Diagramas de Pareto - com nível de significância de 95 % - foram empregados para ilustrar as estimativas dos efeitos principais lineares e de segunda ordem, em valor absoluto, dos fatores em relação às variáveis respostas estudadas. No diagrama de Pareto, a magnitude de cada efeito é representada pelas colunas e a linha transversal às colunas corresponde ao valor de p igual a 0,05 e indica o quão grande deve ser o efeito para ter significado estatístico. O ponto no qual os efeitos estimados são significativos ($p=0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha. As significâncias dos efeitos foram testadas por análise de variância (Box et al. 1978; Montgomery 1997).

3. Resultados

A matriz decodificada e os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^4 , realizado em escala de frascos, estão apresentados na Tabela 3.

Apesar da grande quantidade de trabalhos existentes na literatura sobre biodegradação de petróleo e derivados por diferentes micro-organismos sob diferentes condições ambientais e nutricionais, não foi encontrado nenhum relato sobre biodegradação de querosene por *C. lipolytica* em água do mar, ácida ou extremamente alcalina, com baixa oxigenação, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho foram comparados, em sua maioria, com trabalhos envolvendo outros micro-organismos, fontes de carbono e meios de produção.

Identificação dos melhores meios para biodegradação de querosene em água do mar

No planejamento analisado (Tabela 3), as concentrações de biomassa variaram entre 0,72 e 23,20 g/L em pH 6 e entre 7,46 e 19,40 g/L em pH 14. As concentrações médias da biomassa dos meios com pH 6, 10 e 14 foram respectivamente iguais a $9,58 \pm 7,51$ g/L, $15,28 \pm 0,63$ g/L e $13,43 \pm 4,19$ g/L. Ou seja, em média, as maiores concentrações de biomassa ocorreram em pH alcalino, ratificando o comportamento halo-álcali-tolerante da levedura *C. lipolytica* UCP 0988. Entretanto, apesar da segunda maior concentração de biomassa (19,40 g/L) ter ocorrido no ensaio 12, com pH inicial 14 (querosene 30%v/v, 1 g/L de sulfato de amônio e 20,4 g/L de fosfato monobásico de potássio, tensão superficial 39,36 mN/m, salinidade final 70‰), a maior concentração de biomassa (23,20 g/L), ou seja, o maior percentual de degradação de querosene pela levedura *C. lipolytica* ocorreu no ensaio 3, com pH inicial 6 (querosene 30%v/v, 1 g/L de sulfato de amônio e 6,8 g/L de fosfato monobásico de potássio, tensão superficial final 37,13 mN/m, salinidade final 45‰). Os ensaios 3 e 12 também apresentaram altas atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e emulsões óleo de milho-em-água.

Identificação do melhor meio para produção de BE/BS por Candida lipolytica UCP 0988

em água do mar usando querosene como fonte de carbono

A tensão superficial média dos 20 ensaios do planejamento foi igual a $43,84 \pm 4,94$ mN/m. O ensaio 4 realizado com pH inicial 14, apresentou a menor tensão superficial (33,78 mN/m) do planejamento, atividades de emulsificação média para emulsões água em óleo de milho e água em óleo de motor, respectivamente iguais a 4,754 e 1,75 UAE, salinidade final igual a 60‰ e percentuais de redução de tensão superficial e de elevação de salinidade, respectivamente, iguais a 35,46 e 33,33, sendo portanto considerado um bom meio para produção de biossurfactante. Em contraste, o ensaio 3 realizado com pH inicial 6 e com concentrações de querosene (30%), sulfato de amônio (1,0 g/L) e fosfato

monobásico de potássio (6,8 g/L) idênticas ao do ensaio 4, apresentou a maior tensão superficial (52,36 mN/m) do planejamento, atividades de emulsificação para emulsões água em óleo de milho e água em óleo de motor, respectivamente iguais a 5,161 e 6 UAE, salinidade final igual a 45‰ e percentuais de redução de tensão superficial e de elevação de salinidade respectivamente iguais a 25,46 e 12,50%. A diferença de tensões obtidas nos dois ensaios mostra a forte influência exercida pelo pH sobre a tensão superficial. Os ensaios 3 e 12 que apresentaram maior biodegradação de querosene, apresentaram redução de tensão superficial de 46,85% e 16,85 % respectivamente. Portanto, o ensaio 3 além de ser considerado o ensaio que apresentou maior degradação de querosene, foi também identificado em função do percentual de redução da tensão superficial, como o melhor meio para produção de biossurfactante

A redução da tensão superficial é freqüentemente utilizada como um critério primário para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade de reduzir a tensão superficial (Youssef, 2004). Na literatura encontram-se diversos relatos de excelentes bioemulsificantes que não são capazes de reduzir tensão superficial dos meios (Cirigliano e Carman, 1985; Singh e Desai 1989; Singh et al. 1990) e de bons biossurfactantes que não são bons emulsificantes (Cooper e Paddock, 1984, Plaza et al. 2006). A cepa *Y. lipolytica* NCIM 3589, uma espécie marinha tropical, pode produzir apenas emulsificante na presença de hidrocarbonetos ou petróleo cru. Supostamente, o mecanismo de assimilação de hidrocarboneto se realiza através da aderência da levedura as gotas de óleo, o que faz com que se produza um emulsificante, formado por lipídeo-carboidrato e proteína, associado com a parede celular durante a fase de crescimento. Já na fase estacionária, a levedura *Y. lipolytica* NCIM 3589 libera o emulsificante, em condições de excesso de carbono e limitação de nitrogênio, a um pH inicial de 8, em presença de cloreto de sódio de 2 a 3% (Zinjarde, Pant, 2002). Por outro lado, Franzetti et al 2009 isolaram de local cronicamente contaminado por óleo diesel três estirpes bacterianas pertencentes ao gênero *Gordonia*. Particularmente, *Gordonia* SP. BS29 produziu dois tipos diferentes de compostos microbianos de superfície ativa: bioemulsificantes extracelulares capazes de produzir emulsões estáveis, mas que não

reduzem tensão superficial e biossurfactantes glicolipídios capazes de reduzir a tensão superficial. Também existem vários exemplos de biossurfactantes que tanto baixam a tensão quanto estabilizam emulsões (Albuquerque, 2006; Singer et al. 1985; Rapp et al., 1979).

Efeitos do pH inicial, da concentração inicial de querosene e das fontes de nitrogênio e fósforo sobre a concentração celular (biomassa)

As interações do querosene com o sulfato de amônio, do pH com o querosene e do sulfato de amônio com o fosfato monobásico de potássio, nesta ordem, exerceram efeitos negativos significativos sobre o aumento da concentração de biomassa, produzida por *C. lipolytica* em água do mar usando querosene como única fonte de carbono (Figura 1). Por outro lado, os efeitos das interações do pH com o sulfato de amônio, do pH com o fosfato monobásico de potássio, do querosene com o fosfato monobásico de potássio, nesta ordem, favoreceram o aumento da concentração de biomassa, ou seja favoreceram o aumento da degradação de querosene por *C. lipolytica* em água do mar. O aumento do pH, aumento da concentração de querosene e o aumento da concentração de fosfato de potássio foram os fatores que exerceram individualmente, nesta ordem, os maiores efeitos positivos estatisticamente significativos sobre o aumento da concentração de biomassa e conseqüentemente da degradação de querosene. O aumento da concentração de sulfato de amônio foi o fator individual que exerceu maior efeito negativo sobre o aumento da concentração de biomassa. A comparação dos ensaios 3 e 7 realizados nas mesmas condições, exceto quanto a concentração de sulfato de amônio, deixa evidente o quanto o aumento da concentração de sulfato de amônio, nas condições estudadas, desfavorece o aumento da concentração de biomassa: o ensaio 3 apresentou a maior e o ensaio 7 a menor concentração de biomassa do planejamento. O efeito da curvatura também foi positivo e estatisticamente muito significativo, a curvatura cruza o nível de confiança de 95%, indicando a proximidade do ponto ótimo e a necessidade de planejamento de segunda ordem e de modelo quadrático que incorpore o efeito da curvatura.

Efeitos do pH inicial, da concentração inicial de querosene e das fontes de nitrogênio

e fósforo sobre a tensão superficial

O pH exerceu um efeito negativo altamente significativo do ponto de vista estatístico sobre o aumento da tensão superficial, sendo o único fator que favoreceu a redução da tensão superficial dos meios de biodegradação de querosene e de produção de biossurfactantes (Figura 2). Os efeitos individuais e as interações dos demais fatores e da curvatura não foram estatisticamente significativos.

A forte influência do pH sobre a redução da tensão superficial pode está relacionada com alterações na salinidade provocadas por mudanças de pH. Trabalhos anteriores (Foster 1973; Hill et al. 1973; Chan e Shah, 1977) mostraram que a tensão interfacial é fortemente dependente da salinidade da fase aquosa e que em uma concentração crítica de sal, a tensão interfacial se aproxima de seu valor crítico. Pela mudança da salinidade da fase aquosa, as solubilidades relativas do surfactante no óleo e na água podem apresentar variações significativas. A concentração de surfactante na fase oleosa aumenta com a concentração de sal na fase aquosa.

Efeitos do pH inicial, da concentração inicial de querosene e das fontes de nitrogênio e fósforo sobre as atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de motor e água-em-óleo de milho.

A interação do pH com o fosfato monobásico de potássio exerceu um efeito positivo e o aumento da concentração de querosene um efeito negativo, ambos significativos do ponto de vista estatístico, sobre o aumento da atividade de emulsificação para emulsões *água-em-óleo de motor* (Figura 3). Os demais fatores e interações não apresentaram efeitos estatisticamente significativos. Por outro lado, o aumento do pH inicial de 6 para 14 exerceu um efeito negativo altamente significativo do ponto de vista estatístico sobre o aumento da atividade de emulsificação para emulsões *água em óleo de milho*, obtidas usando o líquido metabólico livre de células dos meios de biodegradação de querosene e de produção de biossurfactantes (Figura 4). Os efeitos individuais e as interações dos demais fatores e da curvatura não foram estatisticamente significativos.

Os efeitos da salinidade sobre as atividades de emulsificação água-em-óleo de milho e água-em óleo de motor são importantes para o correto entendimento da estabilidade das emulsões formadas, considerando que cloreto de sódio é o maior componente da água do mar e freqüentemente quebra a emulsão entre óleo e água do mar (Jung et al. 1995).

Maneerat e Dikit (2007) investigaram os efeitos do pH sobre a atividade de emulsificação do extrato não purificado do biossurfactante produzido por *Miroydes sp.* SM1 para petróleo bruto envelhecido. Precipitação do extrato bruto ocorreu em pH abaixo de 5, mas nenhuma mudança na atividade foi obtida no intervalo de pH variando de 5 a 12. Em pH próximo ao ponto isoelétrico, não existe repulsão eletrostática entre as moléculas vizinhas e os compostos tendem a coalescer e precipitar (Milewski, 2001). O biossurfactante KP2 (surfactin) de *Baccilus sp.* KP2 retém sua atividade em pH variando de 6 a 10 e exibe atividade ótima em pH igual a 6 (Roongsawang., et al. 1999).

Efeitos do pH inicial, da concentração inicial de querosene e das fontes de nitrogênio e fósforo sobre o pH final

O aumento do pH inicial exerceu um efeito positivo altamente significativo sobre o aumento do pH final dos meios de degradação de querosene (Figura 5). A interação do pH com o sulfato de amônio exerceu um efeito negativo estatisticamente significativo sobre o aumento do pH final dos meios. Em todos os ensaios do planejamento, os pHs finais foram inferiores aos pHs iniciais (Tabela 3). A acidificação dos meios de biodegradação de querosene e produção de biossurfactante/bioemulsificante pode ter ocorrido pela produção de ácidos orgânicos () e/ou pela assimilação de íons amônio pelas células, com geração de prótons que diminuíram o pH citoplasmático e estimularam a H⁺ATPase a bombear prótons para o meio externo (Heidrich e Schroeder, 1989). Os demais fatores não apresentaram efeitos estatisticamente significativos.

Efeitos do pH inicial, da concentração inicial de querosene e das fontes de nitrogênio e fósforo sobre a salinidade

O aumento da concentração de fosfato monobásico de potássio, o aumento do pH inicial e a interação do pH com a concentração de fosfato monobásico de potássio, nesta ordem, exerceram efeitos positivos estatisticamente significativos sobre o aumento da salinidade final dos meios de degradação de querosene (Figura 6). A interação do pH com a concentração de sulfato de amônio exerceu um efeito negativo sobre o aumento da salinidade. Os demais fatores não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a salinidade final dos meios de degradação de querosene.

As culturas de *C. lipolytica* UCP 0988 crescidas em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, com pH inicial ajustado para 6, 10 e 14 foram capazes de tolerar salinidades variando entre 4,5 e 6,0%; 5,0 e 5,5 % e 4,5 e 7,5%, respectivamente; demonstrando potencial para biorremediação de água do mar poluída com querosene. Estes resultados revelam o comportamento halotolerante da levedura *C. lipolytica* UCP 0988, capaz de degradar querosene e produzir bioemulsificantes/biossurfactantes em meio com salinidade igual a 7,5%, ou seja. 2,5 vezes mais alta que a salinidade da água do mar (3%). Microorganismos halofílicos requerem altas concentrações de sal para crescimento enquanto microorganismos halotolerantes possuem mecanismos de resposta que permitem sua sobrevivência em meios salinos. Ambos os grupos produzem metabólitos que os protegem da injúria do sal e mantém um balanço osmótico entre as células e o meio ambiente circunvizinho (Rao et al, 2007).

Cinética de Crescimento/Biodegradação Querosene

As taxas de captação e mineralização de matéria orgânica de muitos compostos por populações microbianas no ambiente aquático são proporcionais à concentração do composto, geralmente em conformidade com a cinética de Michaelis-Menten (Boethling et al. 1979, Pfaender et al., 1982).

A cinética de crescimento de *Candida lipolytica* UCP 0988 sobre querosene a 30% (v/v), em água do mar ácida (pH 6) e com baixa oxigenação, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo nas concentrações especificadas no ensaio 3 do planejamento, foi

monitorada durante 5 dias e está ilustrada na Figura 7. Nas primeiras 12 horas, ocorreu uma fase de crescimento exponencial ($Biomassa=0,7789e^{0,7164 \text{ tempo}}$ $R^2=0,9843$, $\mu_{max}=0,05 \text{ h}^{-1}$, $t_g=5,8 \text{ h}$), seguida por uma fase de decaimento linear entre 12 e 48 horas ($Biomassa=-1,83\text{tempo}+8,9267$ $R^2=0,9971$, taxa de decaimento $=-0,1017 \text{ h}^{-1}$) e de uma fase de crescimento logarítmico de 48 a 96 horas ($Biomassa=17,99\text{Ln}(\text{tempo})+3,3018$ $R^2=0,997$, taxa de crescimento $=0,413 \text{ h}^{-1}$). O perfil de crescimento diáuxico apresentado, pode ter ocorrido devido ao consumo inicial de querosene seguido pelo consumo de produtos da biodegradação do querosene como fonte de carbono ou devido à limitação de nitrogênio com posterior reposição de nitrogênio ao meio por lise celular. Segundo Hogg (2005), o fenômeno diáuxico é representado pelo consumo preferencial de um substrato, geralmente o de maior valor energético, seguido pelo consumo de outro substrato também presente no meio, ou de produto gerado durante o metabolismo. O pH do ensaio 3 manteve-se praticamente constante, baixando para 5,68 no final do experimento. Altas atividades de emulsificação para emulsões água em óleo de motor e água em óleo de milho mantiveram-se praticamente constantes variando em torno de 6 e 5 UAE, respectivamente. Por outro lado, houve uma elevação de 12,5 % da salinidade do meio e uma redução da tensão superficial de aproximadamente 25% (Tabela 3).

O trabalho mais próximo ao desenvolvido na presente pesquisa foi realizado por Souza (2009), no qual a levedura *C. lipolytica* cultivada, em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, usando óleo diesel a 5 % (v/v) como única fonte de carbono, apresentou uma curva de crescimento com fase de adaptação de aproximadamente 24 horas e taxa de decaimento celular de $-0,17 \text{ h}^{-1}$ devido à metabolização de compostos tóxicos do diesel. Após esta fase de adaptação, *C. lipolytica* metabolizou os compostos presentes no óleo diesel, na presença da água do mar, com uma velocidade de crescimento celular máxima (μ_{max}) de $0,11 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração (t_g) de 6,4 h, atingindo a biomassa final de 1×10^6 UFC/mL. Durante a fase de adaptação da levedura a salinidade aumentou de 45‰ para 46‰, decrescendo para 44‰ durante a fase de crescimento e mantendo essa salinidade até o final do cultivo. O pH apresentou variações insignificantes em torno de 9,5. A tensão superficial aumentou de 41,9 mN/m no início do cultivo para 49,4 mN/m, decrescendo para 46,6 mN/m nas 24

horas restantes. As atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de motor apresentaram o valor de 6 UAE durante todo o cultivo, enquanto que as atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho apresentaram valores um pouco menores até 72 horas, diminuindo para 5,4 UAE nas últimas 24 horas de cultivo. Esses resultados comprovaram a capacidade de *C. lipolytica* crescer sobre óleo diesel como única fonte de carbono em meio alcalino (pH 9,5) com salinidade variando entre 44 e 47‰.

A biorremediação de solos por *Pseudomonas aeruginosa* AT18, tendo petróleo, óleo lubrificante, naftaleno, tolueno ou querosene, como única fonte de carbono e energia foi estudada por Pérez Silva et al.(2006). Os resultados mostram que os maiores crescimentos foram obtidos com a utilização de querosene (2,5g/L) e óleo lubrificante (2,0g/L). O crescimento de *P. aeruginosa* sobre tolueno (1.2 g/L) e sobre naftaleno foi 70% mais baixo que sobre alcanos. *P. aeruginosa* foi também capaz de crescer sobre petróleo como única fonte de carbono, alcançando concentração de biomassa igual a 0.95 g/L após 20 dias. A curva mostrou crescimento diáuxico, característico da assimilação de duas ou mais fontes de carbono. A primeira fase do crescimento começou entre o primeiro e o segundo dia de incubação e se estendeu até o quinto dia, onde foi observado a fase estacionária, alcançando 0,31g/L de biomassa e taxa de crescimento de $3,5 \times 10^{-2}$ /dia. Uma segunda fase exponencial foi observada com nove dias de incubação. A taxa de crescimento específico foi de $2, \times 10^{-3}$ /dia e a biomassa aumentou para 0,95g/L. A taxa de crescimento diminuiu com o aumento do tempo de incubação para diferentes fases de crescimento exponencial, devido a adaptação contínua das células às moléculas complexas. Na última fase foram degradadas as moléculas mono e poli aromáticas.

Trabalho realizado por Saratale et al (1997) mostrou que o fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 foi capaz de degradar querosene, quando micélio previamente crescido em querosene durante 96 horas, foi inoculado em dois diferentes meios contendo querosene a 10% (v/v) e incubados em agitador rotatório a 30°C e 120 rpm, durante 20 dias. A degradação aeróbica de querosene, pelo referido fungo, no meio 1 (contendo tampão fosfato) e no meio 2 (contendo extrato de levedura), produziu aumentos na utilização de hidrocarbonetos de petróleo e no peso seco. A degradação de hidrocarbonetos totais no querosene no meio 1 foi de 77,5% e no meio 2

de 83,8%. O peso seco do micélio, após a incubação por 20 dias, com querosene, nestes dois meios variou entre 50-51 mg/mL. O pH diminuiu de 7,4 para 6,7 no meio 1 e de 7,2 para 6,6 no meio. A emulsão formada em ambos os meios foi estável. Medidas de perdas abióticas em combinação com estudos de biodegradação ajudaram a evitar a superestimação da atividade de biodegradação e subestimação de outros possíveis mecanismos de perdas de hidrocarbonetos. A perda abiótica medida no final do experimento variou entre 20 e 21% em ambos os meios.

A habilidade de diferentes isolados (*Pseudomonas sp.* AP, *Pseudomonas sp.* CK e *Gordonia sp.* DM) degradarem querosene, em concentrações variando de 2 a 8%, em meio líquido foi investigada por Gouda et al (2007). Os resultados mostram que os percentuais de degradação de querosene variaram entre os diferentes micro-organismos e que cerca de 59 a 94% de querosene foi degradado em 21 dias. Foi observado que células imobilizadas aumentam mais a biodegradação que células livres. Diferentes concentrações de querosene produziram também diferentes resultados. Nos experimentos realizados com querosene na concentração de 6%, a degradação observada foi de aproximadamente de 86-90%, contrastando com os experimentos realizados com querosene na concentração de 2% que atingiram 96-98% de degradação. A tensão superficial não diminuiu o que significa que não houve produção de biossurfactante durante o crescimento sobre petróleo.

Trabalho desenvolvido por Shabir et al (2008) investigou a biodegradação de querosene em solo, usando uma cultura mista de bactérias e dois diferentes tipos de tratamentos T1 e T2, tendo o primeiro baixa concentração de nutrientes em relação ao segundo. Cada tratamento continha 4% (p/p) de querosene no solo como única fonte de carbono. Após 6 semanas de incubação, os tratamentos T1 e T2 exibiram degradação de querosene de 27,7 e 65,77% respectivamente. O maior crescimento bacteriano foi observado em no tratamento T2 como uma redução significativa do teor de querosene no solo, ao longo de 2-3 semanas de incubação. No geral, 46,712 e 54,724% de nitrogênio, 36,73 e 43,73% de fósforo e 24,72 e 35,72% de potássio contidos no solo, foram esgotados respectivamente, nos tratamentos T1 e T2. O referido trabalho definiu exigência

nutricionais para a degradação de querosene, abrindo caminhos para sua biorremediação em solos contaminados.

O tratamento de argila contaminada com querosene usando bioatenuação, bioestimulação e bioaumentação foi estudado por Gouda et al. (2008) usando microcosmos em escalas de laboratório e de campo. Após 7 semanas, 90% do querosene foi degradado pelos processos de bioestimulação e bioaumentação, enquanto apenas 50% foi obtido por atenuação natural. Uréia (46%) e superfosfato (15,5%) foram utilizados como fontes de nitrogênio e fósforo, devido ao baixo custo e disponibilidade local. Células imobilizadas de *Gordonia sp.* DM, *Pseudomonas sp.* AP and *Pseudomonas sp.* CK reduziram o tempo e melhoraram o processo de biodegradação de querosene na argila. O percentual de biodegradação foi 85 a 90% em temperaturas de 21 a 24°C, e apenas de 57 a 68% em temperaturas de 15 a 17°C. O microcosmo em escala de laboratório foi ampliado com grande sucesso para escala de campo. O uso de consórcio dos organismos testados acelerou a taxa de a biodegradação depois de uma semana (74%) em relação aos organismos separados, exceto em relação a *Gordonia sp.* DM (77%). Taxa de degradação máxima (96%) foi atingida pelo consórcio após 7 semanas.

O potencial de degradação de hidrocarbonetos de querosene de avião por uma cepa bacteriana autóctone, isolada de amostras de solo contaminada com derivados de petróleo e identificada como *Norcadia sp.*, foi investigado por Gomes et al (2009). Avaliações de suas habilidades degradativas foram realizadas por ensaios presumíveis como teste indicador redox e por observações da redução da tensão superficial em meio aquoso. A degradação dos hidrocarbonetos do querosene de avião foi avaliada por métodos cromatográficos. As experiências foram realizadas em frascos com duas taxas de bioestimulação. Uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi usada como organismo de referência. A cepa bacteriana *Norcadia sp.* demonstrou elevada habilidade para degradar compostos de querosene de avião, bem como para produzir biosurfactantes, quando comparado com o micro-organismo de referência.

Estudo realizado por Bacosa et al (2010) investigou a habilidade de um consórcio enriquecido degradar frações de querosene em meio Bushnell Haas. A concentração de hidrocarbonetos totais caiu de 10 para aproximadamente 8g/L em 3 dias, equivalendo a

uma degradação de querosene de aproximadamente 20% em 3 dias, após os quais a degradação prosseguiu mais lentamente, parando entre 5 e 7 dias, mas a densidade de bactérias permaneceu relativamente elevada. Fato explicado pela limitação de oxigênio nos meios de cultura. Oxigenases são as enzimas responsáveis pelo ataque inicial aos anéis aromáticos e cadeias alifáticas para as quais oxigênio molecular é necessário (Leahy e Colwell, 1990). O consórcio microbiano utilizou preferencialmente frações aromáticas, que são mais tóxicas que frações alifáticas. Quando as frações de hidrocarbonetos foram degradadas a densidade celular aumentou e o pH caiu de 7 para aproximadamente 5 em 3 dias, quando a máxima degradação foi alcançada. Fase de adaptação (*lag* fase) não foi observada.

Controle da Biodegradação de Querosene em água do Mar

Segundo Altas (1995) para demonstrar que a tecnologia da biorremediação é potencialmente útil, é importante que a habilidade para aumentar as taxas de biodegradação de hidrocarbonetos seja monitorada sobre condições controle.

A Figura 8 ilustra os resultados dos ensaios dos controles positivo (CP3.1); negativo (CN3.1) e estéril (CE3.1) - referentes ao ensaio 3 (E3.1), ensaio do planejamento que apresentou maior concentração de biomassa/degradação de querosene em água do mar (pH inicial 6). Na Figura são também apresentados ensaios controle do efeito da salinidade, realizados nas mesmas condições do ensaio 3, usando água destilada no lugar da água do mar (E3.2) e dos seus controles positivo (CP3.2), negativo (CN3.2) e estéril (CE3.2). A utilização/degradação do querosene no ensaio 3 (E3.1) e do óleo de milho nos controles positivos (CP3.1 e CP3.2) podem ser observadas visualmente através do crescimento da biomassa.

As comparações visuais, após 96 horas, do crescimento da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 - no ensaio 3 (E3.1) e nos correspondentes controles positivo (CP3.1), negativo (CN3.1) e estéril (CE3.1) - deixam evidente a capacidade da referida levedura degradar querosene em água do mar ácida (pH inicial 6) suplementada

com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Nos controles positivos (CP3.1 e CP3.2) houve grande produção de biomassa e de biossurfactantes/bioemulsificantes. Por outro lado, nos controles negativos houve produção de biossurfactantes/bioemulsificantes capazes de formar emulsões água-em-óleo de milho (CN3.1) e emulsões óleo de motor em água (CN3.2) potentes, mas a produção de biomassa/degradação de querosene foi pequena. Estes resultados estão de acordo com observação de que embora a produção de agentes emulsificantes possa aumentar a suscetibilidade dos hidrocarbonetos em um óleo à degradação microbiana, micro-organismos que efetivamente emulsificam um determinado óleo, muitas vezes não degradam totalmente os hidrocarbonetos do referido óleo (Atlas, 1981). Como era previsto, nos controles estéreis não houve produção de biomassa e conseqüentemente também não houve produção de biossurfactantes/bioemulsificantes. A diferença da produção de biomassa entre o ensaio 3 (E3.1) e o respectivo controle estéril (CE3.1) foi altamente significativa do ponto de vista estatístico ($p > 0.05$). Houve também uma diferença estaticamente significativa entre a produção de biomassa do ensaio 3 (E3.1) e a do ensaio E3.2, realizado nas mesmas condições do ensaio 3, exceto pela substituição da água do mar por água destilada. Essa diferença pode ser justificada pela presença na água do mar de sais e metais que estimulam o crescimento microbiano, nas condições estudadas.

O ensaio 3 (E3.1) e os ensaios controles CP3.1, CN3.1, CE3.1, E3.2, CP3.2, CN3.2 e CE3.2 apresentaram índices de emulsificação com 24 horas (IE24) para emulsões água em óleo de milho, respectivamente iguais a 72, 68, 40, 44, 36, 32, 36 e 32 % e para emulsões água em óleo de motor respectivamente iguais a 52, 100, 40, 34, 72, 96, 20 e 36%.

As propriedades de uma emulsão podem evoluir através do tempo devido a uma variedade de processos químicos e bioquímicos (McClements; Weiss, 2004). O termo estabilidade de emulsão é usado no presente trabalho, para descrever a habilidade de uma emulsão resistir a mudanças em suas propriedades através do tempo. As estabilidades após 72 horas de repouso e os tipos das emulsões formadas entre o óleo de milho e os líquidos metabólicos livres de células dos ensaios E3.1, CP3.1, CN3.1, CE3.1, E3.2, CP3.2, CN3.2 e CE3.2, nesta ordem, podem ser analisadas na Figura 9(a). Por

outro lado, na Figura 9(b) é possível analisar as estabilidades após 96 horas de repouso e os tipos das emulsões formadas entre o óleo de milho e os líquidos metabólicos livres de células dos ensaios E3.1, CP3.1, CN3.1, CE3.1, E3.2, CP3.2, CN3.2 e CE3.2, nesta ordem. Em todos os tubos houve formação de emulsões água-em-óleo, exceto no 7º tubo da Figura 9(b), onde além de formação de espuma, houve formação de emulsão óleo-em-água entre o líquido metabólico livre de células do ensaio negativo EN3.2 e o óleo de milho. Segundo Dickinson (1992), emulsões óleo-em-água são estabilizadas por dois tipos principais de agentes emulsificantes moleculares: surfactantes pequenos e polímeros solúveis em água. Percebe-se, claramente, a maior estabilidade e especificidade dos biosurfactantes/bioemulsificantes para formar emulsões com óleo de milho após 96 h, sejam elas do tipo água-em-óleo ou óleo-em-água. Convém também ressaltar que houve formação de espuma e emulsão água-em-óleo entre o líquido metabólico livre de células do ensaio negativo CN3.2 e o óleo de milho. Resultados que indicam que apesar do pequeno crescimento da biomassa no controle negativo (CN3.2) usando água destilada, a levedura excretou bioemulsificantes/biosurfactantes com propriedades espumantes e solubilizantes, capazes de formar emulsão óleo de milho-em-água e emulsão água-em-óleo de milho.

A maioria dos surfactantes é capaz de espumar, o que pode ser um efeito desejável ou não, dependendo da aplicação. A espuma consiste em dois sistemas de fases, termodinamicamente instáveis, de bolhas de gás em líquido, ou seja, é uma emulsão presente na superfície ar/água e esta emulsão permanece estável até haver algum fator que a desestabilize como a utilização de agentes antiespumantes (Peter e Rouette, 1989; Salvini *et al.*, 2006). A habilidade de vários surfactantes formarem espuma tem sido estudada visando a recuperação de óleo usando processo de formação de espuma. A capacidade de formação de espuma de uma solução de surfactante aumenta com o aumento da concentração do surfactante e da temperatura. Além da concentração micelar crítica, a formação de espuma de soluções surfactantes quase permanece constante (Sharma *et al.*, 1984).

Substâncias orgânicas que são insolúveis em água podem ser solubilizadas através do emprego de surfactantes, formando uma emulsão estável. O tipo de micela formada

dependerá da estrutura química do surfactante e dos líquidos a serem misturados. De uma forma geral, a aplicação de surfactantes aumenta a solubilidade dos constituintes do petróleo, sendo que os hidrocarbonetos estarão localizados no núcleo das micelas, enquanto que os compostos fracamente polares, como ácidos graxos, alcoóis e ésteres, estarão na parte externa das micelas (Porter, 1994; Mulligan, 2001).

A formação de emulsões através da produção microbiana e liberação de biossurfactantes é um processo importante na absorção de hidrocarbonetos por bactérias e fungos (Singer et al 1984). Broderick e Cooney (1982) relataram que 96% das bactérias utilizando hidrocarbonetos isoladas de lagos de água doce são capazes de emulsificar querosene, e que culturas mistas de bactérias do solo (Jobson et al 1974) e de ambiente marinho (Rambeloariosa et al 1984) que efetivamente degradam petróleo também apresentam forte atividade emulsificante (Leahy e Colwell, 1990).

Estudos detalhados sobre a estabilidade dos bioemulsificantes produzidos em relação à salinidade estão sendo realizados visando seu uso em ambientes marinhos e indústrias biotecnológicas. Abdel-Mawgoud et al. (2008) estudaram os efeitos da salinidade sobre a atividade de emulsificação de biossurfactantes para investigar sua aplicabilidade em biorremediação de poluição marinha. Foi encontrado que a atividade superficial de teste de ramolipídeos não foi afetada em qualquer grau por altas salinidades, ainda quando as salinidades alcançaram 6%, praticamente o dobro da salinidade da água do mar.

Embora não esteja claro como a salinidade afeta a mineralização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), postula-se que ela afete as interações partícula-HAPs e também a solubilidade dos HAPs (Ashok et al., 1995).

É importante ressaltar que nos ensaios dos controles positivo, tanto no usando água do mar (CP3.1) quanto no usando água destilada (CP3.2), houve grande produção de biomassa (69,39 e 44,7 g/L respectivamente) com utilização/degradação quase total do óleo de milho (Figura 8). As tensões finais nestes dois meios foram respectivamente iguais a $42,73 \pm 0,32$ mN/m e $46,07 \pm 0,64$ mN/m e em ambos as atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e água-em-óleo de motor foram superiores a 6 UAE.

Testes de Fitotoxicidade

Os resultados dos testes referentes a fitotoxicidade após 96 horas dos líquidos biodegradados no ensaio 3 (E3.1) e respectivos controles (CP3.1, CN3.1, CE3.1, E3.2, CP3.2, CN3.2 e CE3.2), apresentados na Tabela 4, sugerem que a salinidade elevada foi mais prejudicial aos feijões que as frações de querosene remanescentes no líquidos biodegradados das placas testes. Como se pode observar na Figura 10, a toxicidade do querosene e salinidade da água do mar inibiram germinações nas correspondentes placas controle. Só ocorreram germinações de feijões na placa controle com água destilada e nas placas testes dos líquidos biodegradados nos ensaios controle do efeito salino: placa do ensaio 3 com água destilada substituindo a água do mar (E3.2) e correspondentes controles positivo (CP3.2), negativo (CN3.2) e estéril (CE3.2).

As técnicas de germinação das sementes e de alongamento de raiz foram concebidas para avaliar os efeitos prejudiciais e toxicidade de compostos (WONG, 1985). O índice de germinação também tem sido bastante usado e tem provado ser um parâmetro muito sensível, uma vez que combina a germinação e crescimento de raízes (Tam e Tiquia, 1994)..

A fitotoxicidade do querosene e níveis de sais dos líquidos metabólicos biodegradados induziram efeitos diferenciados quanto ao porte e aparência dos feijões. Conforme Lima et al. (2001) e Nunes et al (2009), os sais mais solúveis são mais nocivos e podem causar efeitos tóxicos ou mais limitantes, uma vez que as sementes ao absorverem a água, também absorvem íons que, conforme as concentrações, podem causar toxidez e ocasionar distúrbios fisiológicos e decréscimo no potencial de germinação.

Em trabalho sobre tolerância de plantas ao stress salino, Yokoi et al (2002), afirmam que as condições para germinação de sementes nem sempre são adequadas, principalmente em solos salinos ou sódicos, podendo afetar o processo de embebição, que é dependente do potencial hídrico da semente e do meio externo. Outro fator atribuído à salinidade referente a dificuldade de germinação de sementes é a entrada de íons em quantidades tóxicas, na semente. Por outro lado, segundo Debouba et al.(2006) a

salinidade pode ainda interferir na germinação de sementes por outros fatores, como o gasto de energia de reserva da semente para absorver água e posteriormente não dispor desse reservatório para outros processos, induzindo mudanças nas atividades das enzimas catalase, polifenoloxidase e peroxidase.

Os testes de fitotoxicidade foram realizados em triplicatas, a Figura 10, apresenta as melhores placas de cada triplicata. Os índices de germinação das placas testes contendo líquidos metabólicos do ensaio controle da biodegradação de querosene e do efeito salino (E3.2) e dos respectivos controles positivo (CP3.2) e negativo (CN3.2) foram respectivamente iguais a 49,71, 44,2 e 34,15 indicando degradação parcial do querosene (em E3.2 e CN3.2) e do óleo de milho (em CP3.2) com possível formação de produtos tóxicos aos feijões, inclusive bioemulsificantes/biossurfactantes. Os índices de germinação nas placas testes contendo líquidos provenientes dos ensaios controle E3.2 e C3.2 foram aproximadamente iguais e próximos a 50%, valores que ratificam a habilidade da *C.lipolytica* UCP 0988 crescer em ambiente de água doce ou hipersalina e degradar querosene a 30%. Nas placas testes contendo líquidos metabólicos do ensaio controle CN3.2, o índice de germinação e a degradação de querosene foram menores devido a ausência de nutrientes (nitrogênio e fósforo). O índice de germinação nas placas testes contendo líquidos provenientes dos ensaios controle CE3.2 foi igual a 5,51%, ou seja, praticamente não houve germinação nem biodegradação de querosene. A ocorrência de germinações nestas placas sugere a existência na amostra analisada de alguns feijões naturalmente mais resistentes a toxicidade do querosene.

Maciel et al (2010) realizaram trabalho com o objetivo de aclimatar *Penicillium spp.* a concentrações crescentes de querosene de aviação e determinar a fitotoxicidade do material biodegradado. Foram utilizadas as linhagens: *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium aurantiogriseum* e *Penicillium corylophilum*, isolados de local impactado por petroderivados em Suape, Pernambuco, Brasil. Foi realizada uma aclimação dos fungos filamentosos a concentrações crescentes de querosene de aviação (1 a 30% v/v), onde foram determinados o pH, a biomassa e a fitotoxicidade do material biodegradado frente a sementes de *Brassica oleracea var.Capitata*. Todos os micro-organismos foram capazes de produzir biomassa, a 30°C em 7 dias, em presença de até 30% de querosene. O pH

permaneceu ácido em todas as concentrações e *Penicillium griseofulvum* UFPEDA 880 destacou-se quanto a fitotoxicidade do resíduo gerado, sendo este de baixa toxicidade frente as sementes testadas *P. aurantiogriseum* produziu 50g/L de biomassa em 1% de querosene e *P. griseofulvum* produziu 49g/l de biomassa em 9% de querosene. A maior produção de biomassa de *Penicillium corylophilum* (30g/L) ocorreu a 1% de querosene de aviação. *P. griseofulvum* é considerado promissor em processos de biodegradação de concentrações elevadas de querosene de aviação.

A disponibilidade de um composto para os micro-organismos determina sua biodegradabilidade. Geralmente, hidrocarbonetos de baixo peso molecular são mais solúveis em água que compostos de alto peso molecular (Speight, 2005). Portanto, um composto altamente solúvel em água é mais disponível para as enzimas degradantes. A solubilidade de compostos de hidrocarbonetos é também um importante consideração ao avaliar a sua toxicidade para os organismos. Hidrocarbonetos aromáticos são mais tóxicos e os seus efeitos prejudiciais aos organismos são aumentados quando o produto químico é mais solúvel em água, aumentando exposição do organismo ao poluente. Na maioria dos casos, os componentes solúveis são também os mais tóxicos. Portanto, a biodegradação é uma interação entre a solubilidade aquosa do composto e a sua toxicidade (Bacosa et al, 2010). No presente trabalho, nos testes de fitotoxicidade, houve germinação de feijões em todas as placas testes contendo líquidos metabólicos dos ensaios controle da biodegradação de querosene realizados em água destilada (E3.2, CP3.2, CN3.2 e CE3.2), o que sugere que os hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, mais solúveis em água foram os primeiros a serem biodegradados.

Enfim, os resultados obtidos no presente trabalho mostram a grande capacidade de adaptação da levedura *C. lipolytica* a condições extremas de pH e salinidade. A levedura *C. lipolytica* foi capaz de usar querosene (a 10%, 20% ou 30% v/v) como única fonte de carbono e crescer em água do mar, ácida (pH 6) ou alcalina (pH 10 e 14) suplementada com uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, produzindo biossurfactantes com altas atividades de emulsificação. A habilidade da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 degradar querosene em meios com pH 14 e em salinidades até 2,5 vezes a salinidade da água do mar justifica seu enquadramento como um organismo não

convencional modelo superb (Barth e Galardin, 1997), ou seja, com características especialmente originais e geralmente muito significativas em pesquisa fundamental e biotecnologia.

4. Conclusão

A levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 (atualmente classificada como *Yarrowia lipolytica*) é um organismo não convencional, haloalcalitolerante, degradador de hidrocarbonetos e excelente produtor de bioemulsificantes/biossurfactantes. A estabilidade dos bioemulsificantes/biossurfactantes produzidos sobre um largo intervalo de pH e salinidades sinalizam a qualidade dos bioemulsificantes/biossurfactantes produzidos e diversas possibilidades de aplicações industriais; especialmente, na indústria petrolífera e em processos de biorremediação, não apenas de águas oceânicas como também de águas altamente salinas e/ou alcalinas, inclusive com baixa oxigenação. Entretanto estudos complementares devem ser realizados para otimizar as condições de degradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 visando a ampliação (*scale-up*) do processo de biodegradação.

Agradecimentos

A bolsista agradece a FACEPE pelo suporte financeiro

5. Referências

Albuquerque C.D.C., Fileti A.M.F., Campos-Takaki G.M., 2006. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. Can. J. Microbiol. 52, 575-583.

Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H., 2008. Characterization of Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Appl.Biochem. Biotechnol.* ISSN 0273-2289 (Print) 1599-0291 (Online), doi: 10.1007/s12010-008-8285-1.

Al-Tahhan R.A., Sandrin T.R., Bodour A.A., Maier R.M., 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates, *Appl. Environ. Microb.* 66, 3262-3268.

Aoki, K., Shinke, R., Nishira H.,1976. Purification and some properties of yeast tannase. *Agr. Biol. Chem.* 40, 79-85.

Arulazhagan,P., Vasudevan, N. , 2011. Role of nutrients in the utilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by halotolerant bacterial strain. *Journal of Environmental Sciences* 2011, 23(2) 282–287

Atlas, R. M., Bartha, R.,1972. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: Limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 309–318.

Atlas, R.M.,1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiology Review* 45, 180-209.

Atlas, R.M., 1995. Bioremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodet.Biodeg.*, 317-327.

Bacosa, H., Suto,K., Inoue, C., 2010. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *Int. Biodet. Biodeg.* 64, 702-710.

Barth, G., Gaillardin, C., 2006. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Review* 19, 219-237.

Bertrand , J-C.; Bianchi ,M. ; Al Mallah ,M.; Acquaviva , M.; Mille, G., 1993. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. J. Esp. Mur. Biol. **Ecol.**, 168 125-138

Blenkinsopp S, Sergy G, Wang Z, Finges MF, Foght J, Westlake DWS (1995) Oil spill bioremediation agents—Canadian efficacy test protocols. In: American Petroleum Institute (ed) Proceedings of the 1995 international oil spill conference, Feb 27—March 2, Long Beach. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp 91—96.

Boethling, R. S., and M. Alexander. 1979. Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 37:1211-1216.

Broderick, L. S., and J. J. Cooney. 1982. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. Dev. Ind. Microbiol. 23:425-434.

Chan, K.S. and Shah, D.O., (1977). The molecular mechanism for achieving ultra-low interfacial tension. 51st Symp. on Surface and Colloid Science, Grand Island, N.Y., June 19-22, Paper No.510.

Cirigliano MC, Carman GM (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 48:747-750.

Cirigliano MC, Carman GM (1985) Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 50:846-850.

Cooper DG, Goldenberg BG (1987) Surface active agents from two *Bacillus species*. Appl Environ Microbiol. 53:224—229.

Cooper DG, Padock DA (1984) Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Applied and Environmental Microbiology 173-176.

Crosman J.T., Pinchuk R.J., Cooper D.G. (2002) Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 5, 467-472.

Debouba, M.; Gouia, H.; Suzuki, A.; Ghoebel, M.H. (2006) NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 163:1247-1258.

Dickinson, E., 1992. Interfacial interactions and the stability of oil-in- water emulsions. *Pure and App Chem.* 64,1721-1724.

Foster, W.R., 1973. A low-tension waterflooding process. *J. Pet. Technol.* 25, 205-210.

Franzetti A, Caredda P, La Colla P, Pintus M, Tamburini E, Papacchini M, Bestetti G (2009) Cultural factors affecting biosurfactant production by *Gordonia* sp. BS29. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:943–947.

Gaad, G.M., 2001. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press. 496p.

Gomes EB, Soriano AU , Miranda RCM, Souza, MFVQ, Pereira Jr N.2009 Biodegradation of Stored jet Fuel by a *Nocardia* sp. Isolated from Contaminated Soil . *Braz Arch of Biol Technol* 52:5:1279-1284

Gouda, M.K.; Omar, S.H.; Eldin, H.M.N.; Zohra A. Chekroud, Z.A. (2008) Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay (Laboratory and field: scale microcosms). *World J Microbiol Biotechnol* 24:1451–1460.

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

Heidrich, r., Schroeder, J.I., 1989. The physiology of ions chanel and eletrogenics pumps in higher plants. *Annual Reviews of Plants Physiology* 40, 539-569.

Hill, H.J., Reisberg, J. and Stegemeier, G.L., 1973. Aqueous surfactant system for oil recovery. *J. Pet. Technol.*, 25(2): 186-194.

Hogg S (2005) *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons. 480 p

Jobson, A., M. McLaughlin, F. D. Cook, and D. W. S. Westlake. 1974. Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. *Appl. Microbiol.* 27:166-171.

Juhasz, A., Stanley, G.A., Britz, M.L., 2000. Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: Effects on Microtox and mutagenicity bioassays. *Bioremediation J.* 4, 271–283.

Kalme S, Parshetti G, Gomare S, Govindwar S 2008 Diesel and Kerosene Degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386 *Curr Microbiol* (2008) 56:581–586

Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990 *Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment*. *Microbiological Reviews*, 54:3:305-315.

Lima KL, Cavalcante LF, Feitosa Filho JC (2001). Efeitos de fontes e níveis de salinidade da água de irrigação sobre a germinação e o crescimento da pinheira. *Engenharia Agrícola*, 21:2:135-144,.

Maneerat ST, Dikit P (2007) Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 29(3):770-779.

McClements DJ, Weiss J. *Lipid Emulsions*. In: Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6th ed. New York: John Wiley Publishers; 2004.

Maciel CSM, Souza CS, Silva R, Vilela ALS, Sousa MFVQ, Gusmão NB (2010) Degradação de Querosene de aviação por *Penicillium spp.* *Dialogo & Ciencia*, 23:69-77.

Mulligan, C.N.; Yong, N.R.; Gibbs, F.B. (2001) Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, vol. 60, pp 271-380.

Nunes AS, Lourenção ALF, Pezarico CR, Scalon SPQ, Gonçalves MC (2009) Fontes e níveis de salinidade na germinação de sementes de *Crotalaria juncea* L.. *Ciênc. Agrotec.* 33:3:753-757.

Pérez Silva, R.M.; Rodríguez; Montes de Oca, J.M.G.; Moreno, D.C. M., 2006. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas Aeruginosa* AT18 strain. *Tecnología Química* 26:170-77.

Peter, M.; Rouette, H.K. *Grundlagen der Textilveredlung*, Frankfurt am Main, pp.285-301.1989.

Pfaender, F. K., and G. W. Bartholomew. 1982. Measurement of aquatic biodegradation rates by determining heterotrophic uptake of radiolabeled pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:159-164.

Porter, M.R.; *Handbook of surfactants*. Blackie Academic & Professional. Second Edition. 324p. 1994.

Rambeloarisoa, E., J. F. Rontani, G. Giusti, Z. Duvnjak, and J. C. Bertrand. 1984. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Mar. Biol. (Berlin)* 83:69-81.

Rao AR, Dayananda C, Sarada R, Shamala TR, Ravishankar GA 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology* 98:560-64.

Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F (1979) Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. J. Gen. Microbiol. 115:491-503.

Roongsawang N, Thaniyavarn J and Thaniyavarn S (1999) Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. Thai J. Biotechnol. 1:54-60.

Sadouk Z, Hacene H, Tazerouti A (2008) Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a *Rhodococcus* Strain. Oil Gas Sci Tech, 1-7.

Salvini, V.R.; Garcia, J.R.; Oliveira, I.R.; Pandolfelli, V.C. Agente espumante e seus efeitos nas propriedades físicas de alumina porosa Cerâmica vol.52 no.321 São Paulo Jan./Mar. 2006

Saratale, G.; Kalme, S.; Bhosale, S.; Govindwar, S. (2007) Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. Journal of Basic Microbiology, 47, 400–405.

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

Sharma, M.K.; Shah, D.O.; Birgham, W.E., 1984. Correlation of chain length compatibility and surface properties of mixed foaming agents with fluid displacement efficiency and effective air mobility in porous media. Ind.Eng.Chem. Fund. 23,2:213-220.

Silva TAL, Araújo HWC, Tambourgi EB, Alves da Silva, CA, Campos-Takaki GM (2009) Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato.

Singer ME, Finnerty.WR 1984. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes, p, 1-60. In R. M. Atlas(ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., New York.

Singer, TP, Salach JI and Crabtree D. (1985). Reversible inhibition and mechanism-based irreversible inactivation of monoamine oxidases by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem Biophys Res Commun* 127:707-712.

Song HG, Bartha R (1990) Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl Environ Microbiol* 56:646– 651.

Souza, FASD.; Silva, J.F.; Salgueiro, A.A.; Albuquerque, C.D.C. 2009. Produção de Emulsificantes/Biosurfactantes por *Cândida lipolytica* em Água do Mar usando Óleo Diesel como Fonte de Carbono. In :XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal, RN, 02 a a 05 de agosto de 2009.

Speight, J.G., 2005. Environmental analysis and technology for the refining industry. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA.

Tam NFY, Tiquia S (1994) Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique *Resources, Conservation and Recycling*, 11:261-274.

Tiquia SM,Tam NFY, Hodgkiss IJ (1996) Effects of Composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution* 93(3):249-256.

Tsugawa , R.; Nakase, T.; Koyabashi , T.; Yamashita, K.;Okumura, S. (1969) Fermentation de n-parafins by yeast. Part III: Alfa-ketoglutarate productivity of various yeast. *Agr. Boiol. Chem. (tokyo)* 33, 929-938.

Watanabe, K., Futamata, H., Harayama, S., 2002 Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of biodegradation strategies, *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 655-663.

Willumsen, P.A., Karlson, U., 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soil, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7, 415–423.

Wong, M. H. (1985). Effects of animal manure composts on tree (*Acacia confisa*) seedling growth. *Agric. Wastes*, 13,261-272.

Yokoi, S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. (2002) Salt stress tolerance of plants. Jircas Working Report, 1:25-33.

Zhang Y., Miller R.M. (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant), *Appl. Environ. Microb.* **58**, 10, 3276-3282.

Zhang Y., Miller R.M. (1995) Structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes, *Appl. Environ. Microb.* **61**, 6, 2247- 2251.

Zinjarde S, Chinnathambi S, Lachke AH, Pant A (1997) Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. *Lett. Environ. Microbiol.*, v.37, p. 414-420.

Tabela 1 Caracterização físico-química de água do mar*

Parâmetro Físico-química	Valor
Condutividade elétrica a 20° C	53500,00
Dureza Total	6800,00
Cálcio (mg/L em Ca)	480,96
Magnésio (mg/L em Mg)	1361,92
Sódio (mg/L em Na)	11200,00
Potássio (mg/L em K)	550,00
Cloretos (mg/L em Cl)	20000,00
Sulfatos (mg/L em SO ₄)	3272,72

*Praia próxima a refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, em Pernambuco.

Tabela 2 . Níveis e valores dos fatores do planejamento fatorial completo 2^4

Fator	Nível		
	-1	0	+1
pH	6	10	14
Querosene (% v/v)	10	20	30
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	1,0	6,0	11
KH ₂ PO ₄ (g/L)	6,8	13,6	20,4

Tabela 3 – Composições dos meios de biodegradação de querosene e produção de bioemulsificantes/biossurfactantes e resultados, com 96h, de biomassa, atividade de emulsificação e tensão superficial dos ensaios do planejamento fatorial completo 2⁴, realizado em escala de frascos

Ensaio	Variáveis Independentes				Variáveis Respostas					
	pH inicial	Querosene (%v/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	pH final	Sal (‰)	Biomassa (g/L)	TS (mN/m)	AE1 (UAE)	AE2 (UAE)
1	6	10	1,0	6,8	5,6	45	3,86	44,45	5,524	6
2	14	10	1,0	6,8	12,53	55	7,46	36,6	5,792	6
3	6	30	1,0	6,8	5,68	45	23,20	37,13	5,446	6
4	14	30	1,0	6,8	12,72	60	7,62	33,78	4,754	1.75
5	6	10	11,0	6,8	5,68	60	12,1	49,64	5,524	6
6	14	10	11,0	6,8	11,39	60	17,36	41,97	5,446	6
7	6	30	11,0	6,8	5,82	55	0,72	44,8	5,842	6
8	14	30	11,0	6,8	10,01	50	12,98	39,81	5,338	6
9	6	10	1,0	20,4	5,56	60	6,06	46,07	5,462	6
10	14	10	1,0	20,4	12,57	75	14,74	44,22	4,048	6
11	6	30	1,0	20,4	5,7	55	17,04	51,18	5,718	1.324
12	14	30	1,0	20,4	11,8	70	19,40	39,36	4,678	6
13	6	10	11,0	20,4	5,3	50	4,70	43,81	5,142	4.266
14	14	10	11,0	20,4	7,75	70	14,20	38,68	5,398	6
15	6	30	11,0	20,4	10,01	65	9,10	39,09	5,222	1.542
16	14	30	11,0	20,4	11,4	70	13,70	43,1	4,886	6
17	10	20	6,0	13,6	7	55	14,88	49,5	5,65	6
18	10	20	6,0	13,6	8,27	55	15,5	45,95	5,158	6
19	10	20	6,0	13,6	7	50	14,66	44,46	5,464	6
20	10	20	6,0	13,6	8,09	55	16,06	47,94	5,066	6

Sal –Salinidade TS-Tensão Superficial AE-Atividade de Emulsificação: (1) óleo de milho (2)óleo motor

Tabela 4 - Resultados de teste de fitotoxicidade com feijão macacará (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.)

Feijão	Comprimento das raízes dos feijões germinados (cm)														
	Germinação em água destilada			Germinação em líquido biodegradado do ensaio 3 (com água destilada)			Germinação em líquido biodegradado do controle positivo (com água destilada)			Germinação em líquido biodegradado do controle negativo (com água destilada)			Germinação em líquido biodegradado do controle estéril (com água destilada)		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	1,0	5,5	6,5	3,5	1,5	0,5	4,0	2,5	1,5	1,5	0,5	3,0	5,0	1,5	4,0
2	1,0	6,0	4,5	4,5	1,5	4,5	7,0	0,7	2,5	5,0	1,0	5,0	4,5	0,5	3,0
3	1,0	7,0	8,0	6,5	0,5	1,5	5,5	1,0	1,0	4,5	1,0	1,5	0,0	6,0	0,0
4	1,3	5,5	9,5	4,5	0,5	3,0	4,5	1,5	2,5	2,5	1,0	2,5	0,0	1,0	0,0
5	1,5	9,5	5,0	7,5	0,5	4,5	7,0	1,5	5,5	1,5	3,5	2,0	0,0	0,0	0,0
6	3,5	7,0	4,5	3,5	7,0	5,0	1,5	2,5	3,5	1,0	3,0	4,5	0,0	0,0	0,0
7	1,5	12,5	3,5	3,0	0,0	0,0	0,5	5,0	2,0	1,0	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0
8	1,0	5,5	1,0	7,5	0,0	0,0	0,0	0,5	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
9	0,0	5,0	6,5	7,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0
10	0,0	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0
Feijões Germinados	8	10	10	9	6	6	7	10	10	7	6	10	2	4	2
Comprimento médio raízes (cm)	4,41			2,60			2,27			1,83			0,85		
Porcentagem Germinação				75,00			96,43			82,14			28,57		
Porcentagem Crescimento da Raiz				58,96			51,55			41,57			19,27		
Índice de Germinação				44,22			49,71			34,15			5,51		

Legendas das Figuras

Figura 1- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a concentração de biomassa e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio.

Figura 2- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a tensão superficial e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio.

Figura 3 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-motor e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio.

Figura 4- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-milho e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio

Figura 5 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta o pH final e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio

Figura 6- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^4 tendo como variável resposta a salinidade e como variáveis independentes: (1) pH (2) concentração de querosene (3) concentração de sulfato de amônio e (4) concentração de fosfato monobásico de potássio

Figura 7 – Cinética de crescimento e biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica*

Figura 8 - Ensaio de biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* em água do mar (ou água destilada) com pH inicial 6, a 28° C e 200 rpm, durante 96 horas e controles positivo, negativo e estéril. (a) Melhor ensaio de biodegradação: ensaio 3 (E3.1) em água do mar (b) Controle positivo (CP.3.1) do ensaio 3 em água do mar (c) Controle negativo (CN3.1) do ensaio 3 em água do mar (d) Controle estéril (CE3.1) do ensaio 3 em água do mar (e) Controle em água destilada do ensaio 3 (E3.2) (f) Controle positivo (CP3.2) do ensaio controle E3.2 (g) Controle positivo (CP3.2) do ensaio controle E3.2 (h) Controle estéril (CE3.2) do ensaio controle E3.2.

Figura 9 - (a) Emulsificação de óleo de milho com 72 h de repouso. Tubos 1-4: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água do mar. Tubos 5-8: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água destilada. (b) Emulsificação óleo de milho após 96 h de repouso. Tubos 1-4: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e nos controles positivo, negativo e estéril com água do mar. Tubos 5-8: Fase aquosa: líquidos biodegradados no ensaio 3 e controles positivo, negativo e estéril com água destilada.

Figura 10 - Resultados de teste de fitotoxicidade de líquido degradado por *Candida lipolytica* UCP 0988 sobre a germinação de feijão macaçar (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.). Placas superiores (da esquerda para a direita) – Placas controles com querosene, água destilada e água do mar. Placas inferiores (da esquerda para a direita) – Placas com material biodegradado livre de células, nas condições do ensaio 3 e dos respectivos controles positivo, negativo e estéril, exceto pela substituição de água do mar por água destilada.

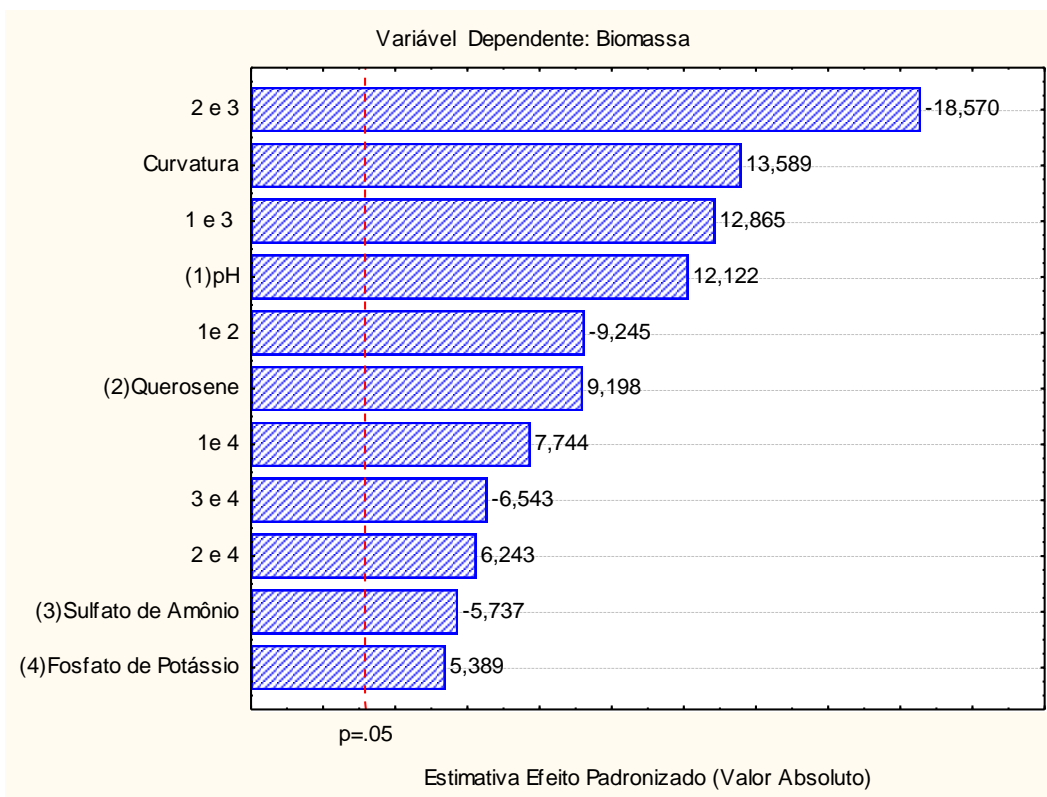


Fig. 1

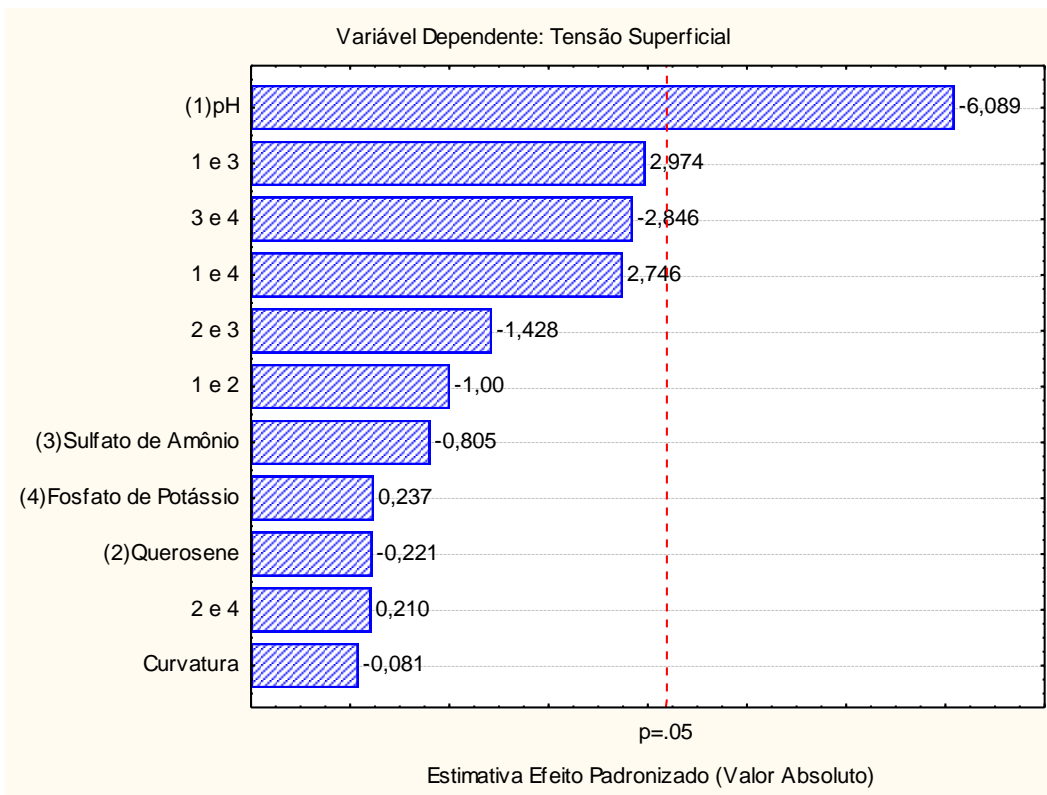


Fig. 2

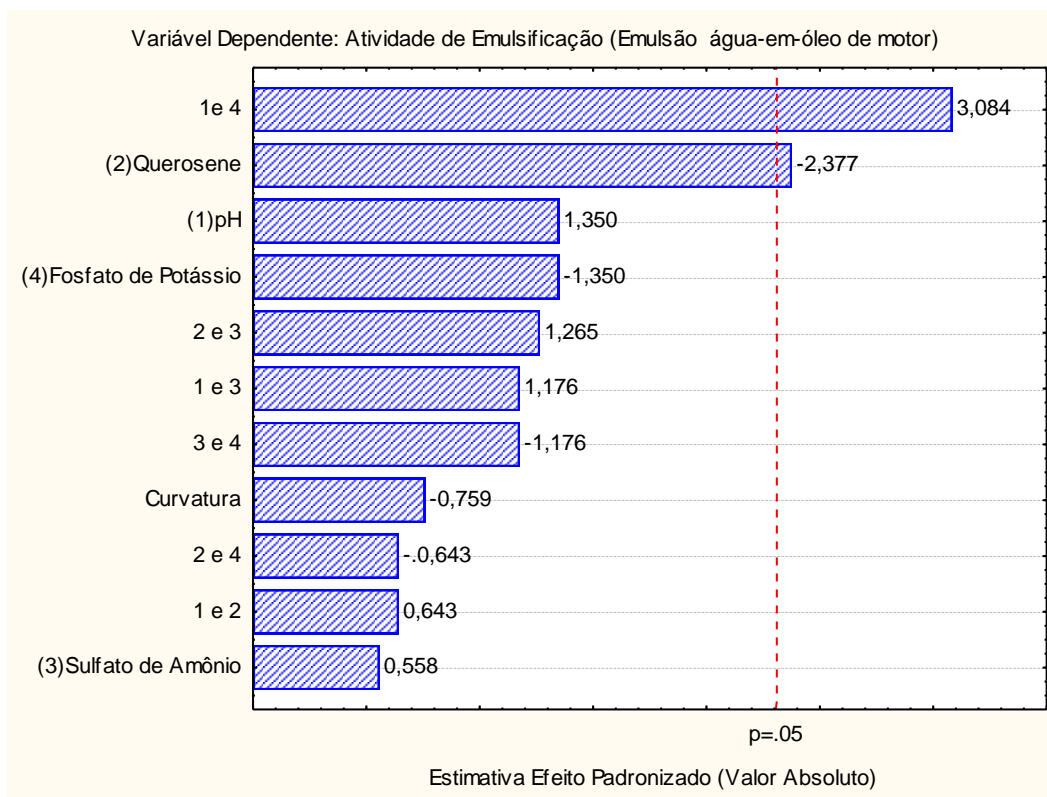


Fig. 3

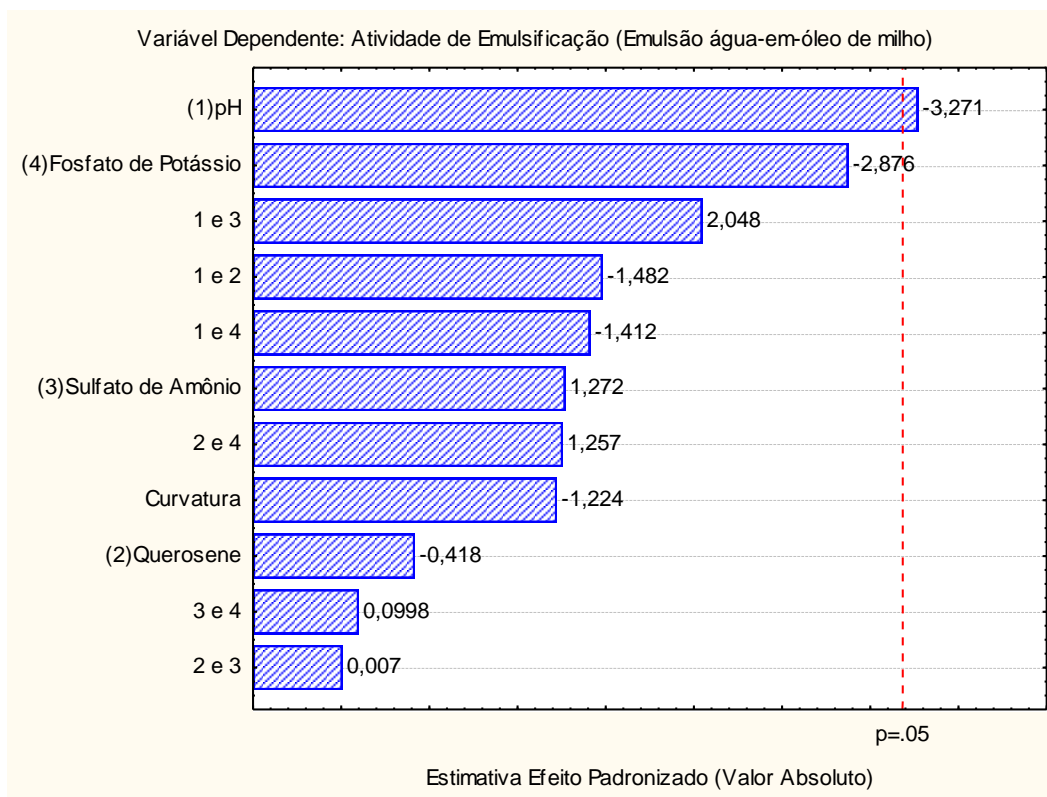


Fig. 4

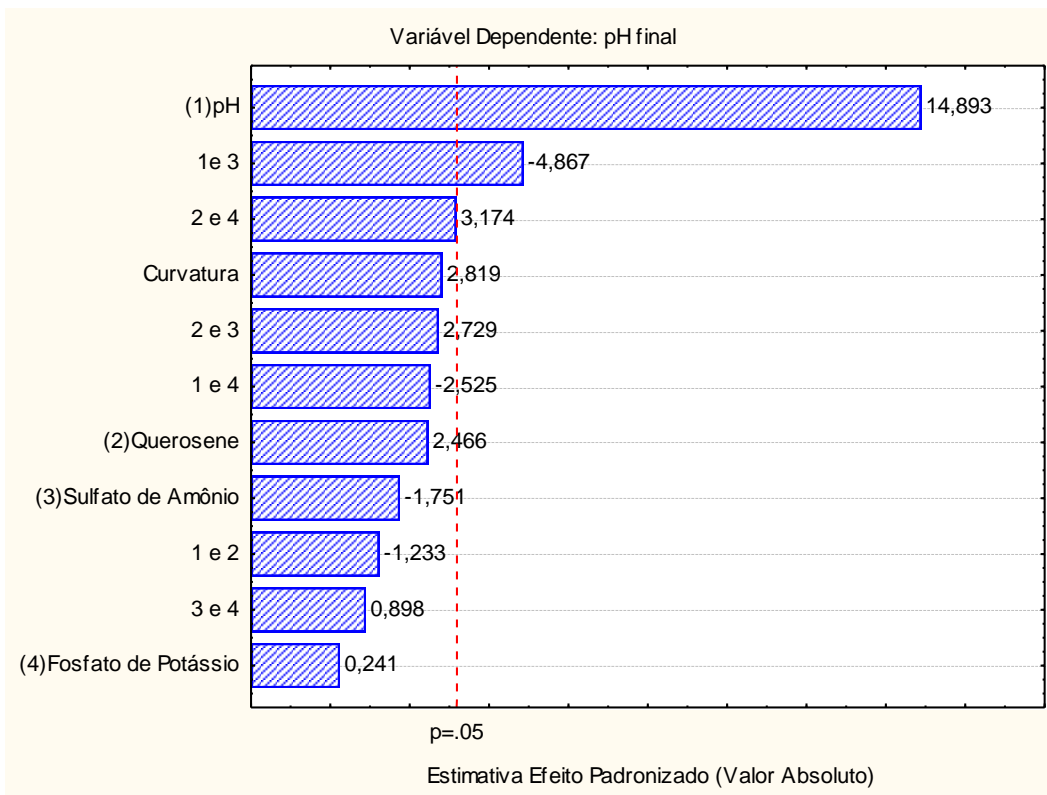


Fig. 5

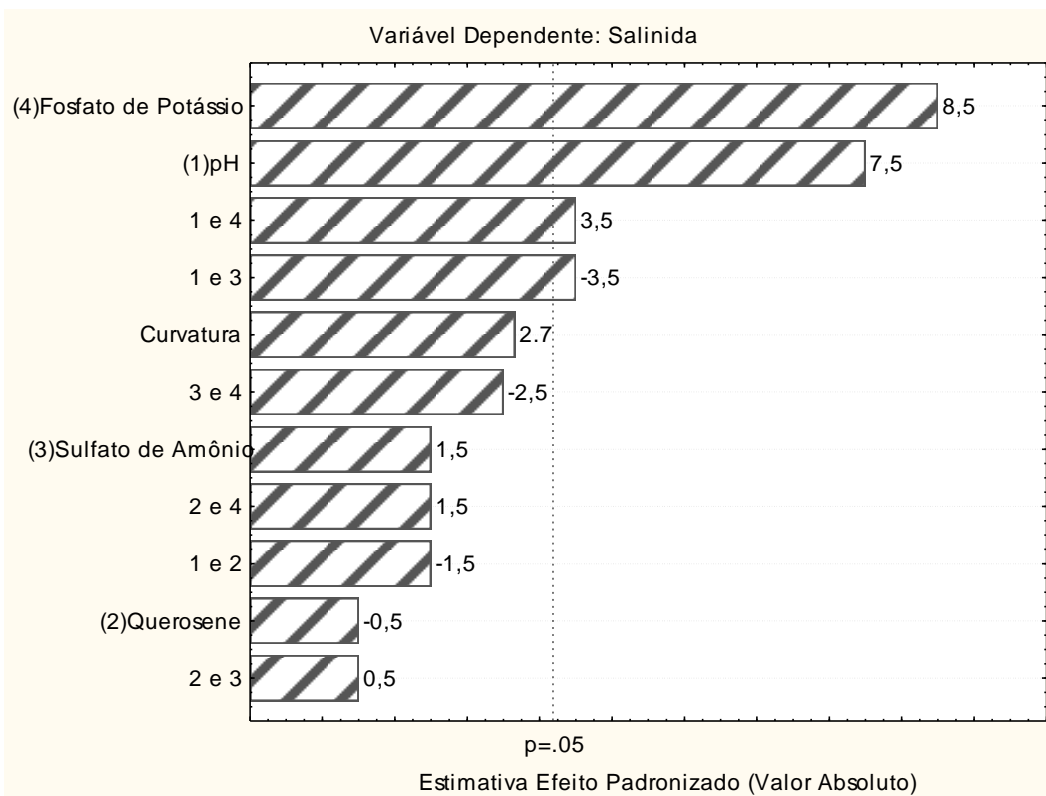


Fig. 6

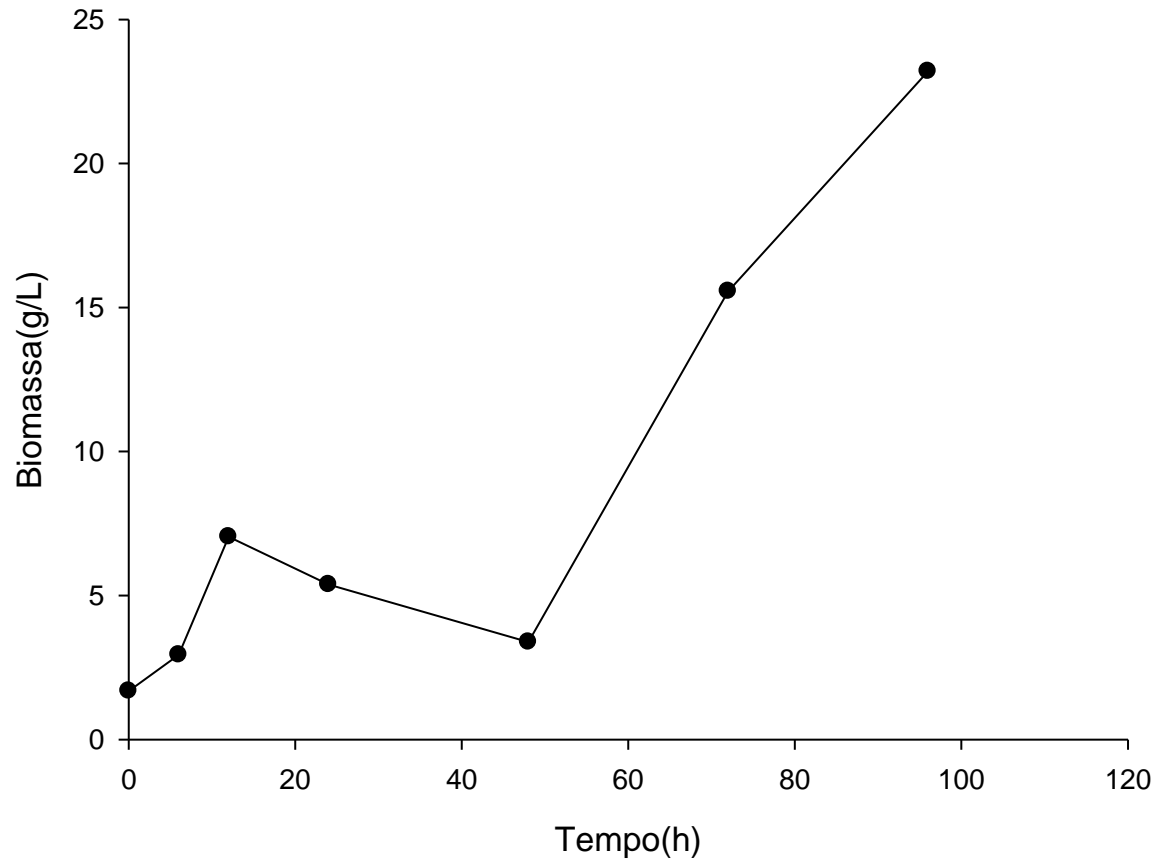


Fig. 7

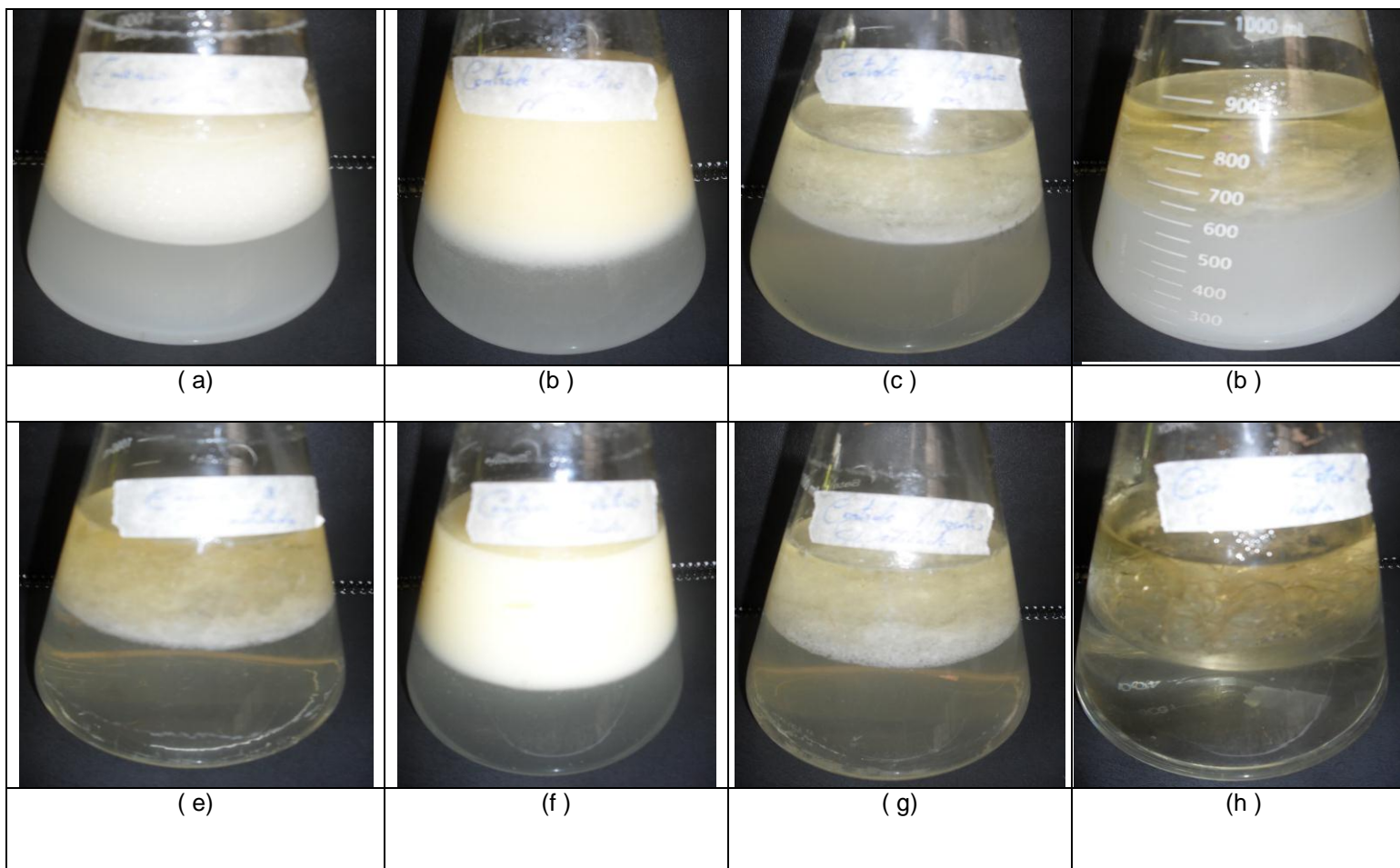


Fig. 8

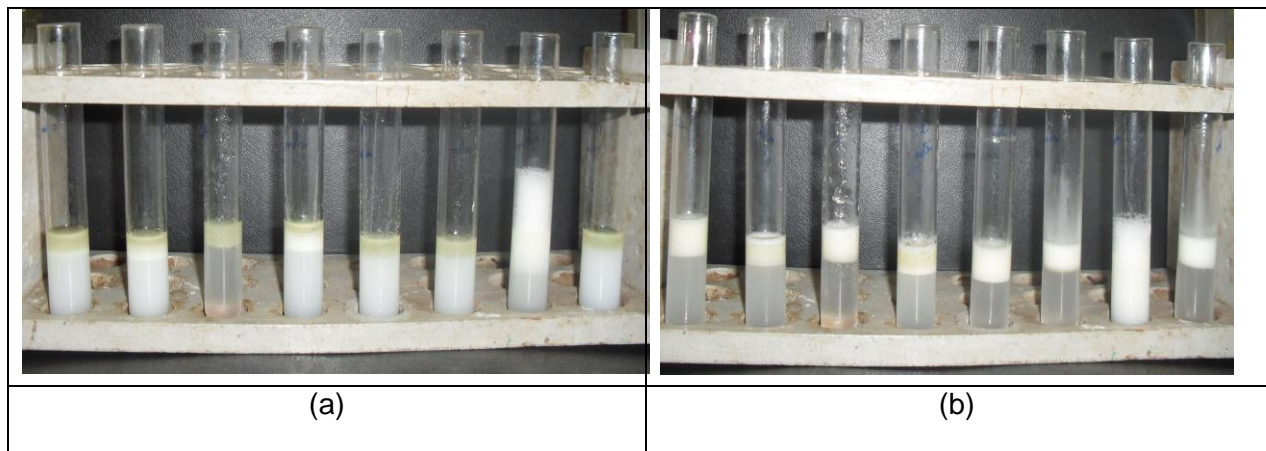


Fig. 9

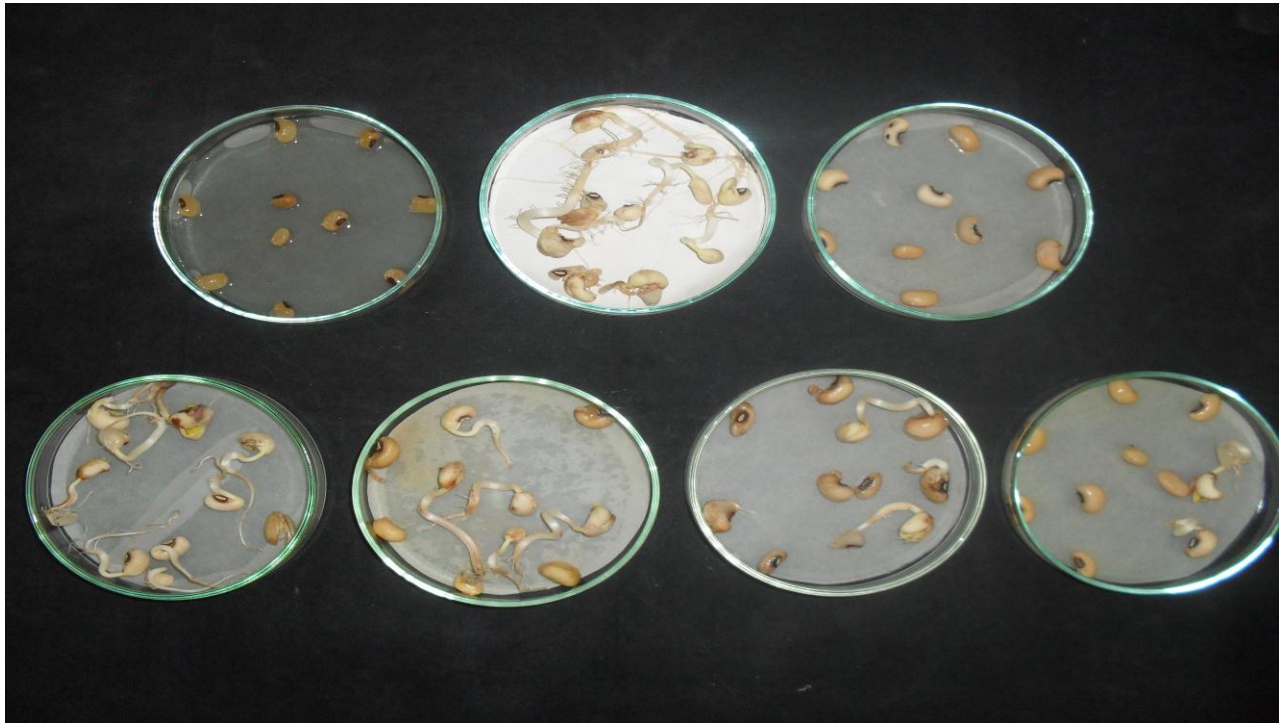


Fig. 10

Capítulo 4

Conclusões gerais

A levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 apresenta propriedades não convencionais como tolerância extrema a ambientes altamente salinos e/ou alcalinos (pH 14) e/ou ácidos.

A levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 é capaz de degradar querosene e produzir bioemulsificantes/biossurfactantes em água do mar, ácida ou alcalina, com baixa oxigenação, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

O uso de água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo como meio para biodegradação de querosene e produção de biossurfactante constitui-se em uma alternativa extremamente eficaz e econômica em relação aos meios tradicionalmente empregados.

Os biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos por *Candida lipolytica* UCP 0988 possuem potencial para aplicações em biorremediação de ambientes marinhos contaminados por querosene e outros derivados de petróleo.