



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

Maria Luísa Oliveira Mergulhão de Freitas Henriques

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO  
DE ÓLEO DIESEL POR *CANDIDA LIPOLYTICA*  
UCP 0988 EM ÁGUA DO MAR**

**Recife**

**2013**

Maria Luísa Oliveira Mergulhão de Freitas Henriques

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO  
DE ÓLEO DIESEL POR *CANDIDA LIPOLYTICA*  
UCP 0988 EM ÁGUA DO MAR**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

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

Orientadora: Prof. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

**Recife**

**2013**

H519o Henriques, Maria Luísa Oliveira Mergulhão de Freitas  
Otimização de processo de biodegradação de óleo diesel por  
*Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar / Maria Luísa Oliveira  
Mergulhão de Freitas Henriques ; orientador Clarissa Daisy da Costa  
Albuquerque, 2013.

148 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.  
Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado  
em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2013.

1. Biodegradação. 2. *Candida lipolytica*. 3. Diesel - Biodegradação.  
4. Biossurfactantes. 5. Água do mar. 6. Biorremediação marinha. I. Título.

CDU – 628.16

Josefa Vital de Oliveira- CRB-543

# OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988 EM ÁGUA DO MAR

MARIA LUÍSA OLIVEIRA MERGULHÃO DE FREITAS HENRIQUES

**Examinadores:**

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão – Titular Externo  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Aos meus amados avós que se foram e não tiveram a oportunidade de presenciar mais uma etapa da minha vida fechando seu ciclo: Maria Oliveira Mergulhão, Ivete Vieira de Freitas Henriques e Fernando Antônio Cabral de Freitas Henriques Também estendo esta homenagem a Lúcia de Fátima dos Santos Machado, educadora infantil, quando finalizo e entrego hoje, no dia do seu aniversário, este trabalho (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelos momentos bons vivenciados durante o curso e por ter me guiado melhor do que o esperado entre tantos atropelos e momentos difíceis enfrentados no decorrer do Mestrado;

À minha família (Maria do Carmo Oliveira Mergulhão de Freitas Henriques, Fernando Antônio Cabral de Freitas Henriques Júnior, Fernando Antônio Cabral de Freitas Henriques Neto, Stela Ângela Vieira de Freitas Henriques e João Antônio Araújo de Freitas Henriques) por sempre ter me direcionado no valor e no caminho dos estudos e livros, pelo apoio incondicional, fazendo-se presente em todas as minhas conquistas e servindo de exemplo e apoio em diversas situações;

Aos meus amigos e amigas por terem compreendido minha ausência em diversas situações, mas que também participaram dos meus poucos momentos de lazer nesses dois anos, ajudando a diminuir a tensão das responsabilidades e também dos momentos mais delicados que enfrentei recentemente, em especial, agradeço a Jéssica Alice dos Santos Machado e Elijane Áurea dos Santos;

À Profa. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, minha orientadora, que com muita paciência, incentivo, destreza e otimismo me conduziu à plena realização das atividades científicas (em laboratório e em sala de aula), conhecendo e aprimorando todo o meu potencial como aluna. A ela, também aproveito para agradecer pela amizade e exemplo de profissional exemplar, demonstrados pela sua competência, inteligência, ética, retidão e pela forma leve de enxergar o mundo e a vida;

À Coordenadora do curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais - MDPA; Profa. Dra. Alexandra Amorin Salgueiro por quem tenho muito carinho e admiração pelo fato dela emanar sempre pensamentos positivos, pelo seu apoio (do início ao fim), por incentivar continuamente a não desistir e desanimar, por seus ricos aconselhamentos e infinita paciência e bondade. A ela o meu muito obrigada, de coração;

À FACEPE, que investiu financeiramente nesses dois anos através da bolsa científica.

À Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP; Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki por sua inesgotável dedicação à sua função, por disponibilizar as instalações, equipamentos e insumos para o desenvolvimento do projeto.

Ao corpo de professores da pós-graduação que me acompanhou dentro e fora do laboratório no desenvolver do curso de mestrado: Prof. Dr. Antonio Mendes da Silva Filho, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Profa. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, Profa. Dra. Eliane Cardoso de Vasconcelos, Prof. Dr. Emerson Alexandre de Oliveira Lima, Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki, Profa. Dra. Kaoru Okada e Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos. Estendo meus agradecimentos à equipe da Secretaria do Mestrado, sempre muito gentil e atenciosa.

Aos funcionários Sr. Humberto, André Filipe, Charles Francisco, Hilder e D. Sônia Maria por nos acompanhar.

Registro também o meu muito obrigada aos meus amigos e colegas de laboratório, Adamares Marques da Silva, Adonias Barreto de Paiva, Fabiane Seger e Maria Andreza Bezerra Correia, pelo apoio e tempo dedicado. Agradeço por terem dedicado um pouco do seu tempo, individualmente e coletivamente. Sem a presença deles, algumas coisas teriam sido mais difíceis. Agradeço pelas cansativas, porém divertidas coletas de água do mar; esses momentos não teriam a mesma alegria sem vocês!

O meu super obrigada também a uma pessoa muito especial na minha formação, Josenir Alves, que foi, é e sempre será uma das minhas referências do que é ensinar com dedicação e gentileza. Agradeço inclusive pelo dia dedicado a vir a Recife para assistir minha defesa da dissertação. Foi uma feliz surpresa que nunca esquecerei.

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>SUMÁRIO</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1.1 Introdução</b> .....	2
<b>1.2 Objetivos</b> .....	5
1.2.1 Objetivo Geral .....	5
1.2.2 Objetivos Específicos .....	5
<b>1.3 Revisão da Literatura</b> .....	6
1.3.1 Hidrocarbonetos .....	6
1.3.2 Petróleo .....	7
1.3.3. Óleo Diesel .....	8
1.3.4. Biodiesel .....	9
1.3.5 Mistura de Óleo Diesel e Biodiesel .....	9
1.3.6 Surfactantes Sintéticos.....	10
1.3.7 Biossurfcantantes .....	11
1.3.8 Poluição de mares e oceanos por hidrocarbonetos .....	13
1.3.9 Biorremediação microbiana .....	15
1.3.10 Biodegradação .....	17
1.3.11 Fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos .....	21
1.3.12 Micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos .....	27
1.3.13 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	29
1.3.14 Otimização de Processos de Biodegradação de Hidrocarbonetos .....	31
<b>1.4 Referências Bibliográficas</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	47
Primeiro Artigo - Modelagem de concentração de biomassa e estudo dos efeitos do pH e nutrientes em processo de biodegradação de óleo diesel por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar.....	48
<b>Resumo</b> .....	49

<b>1. Introdução</b> .....	50
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	53
2.1 Micro-organismo e Meio de Preservação .....	53
2.2 Óleo Diesel .....	53
2.3 Água do mar .....	54
2.4 Determinações Analíticas .....	54
2.5 Planejamento Fatorial dos Ensaio de Biodegradação de Óleo Diesel .....	55
2.6 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) .....	56
<b>3. Resultados</b> .....	57
3.1 Identificação dos melhores meios para biodegradação de óleo diesel por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em água do mar .....	58
3.2 Modelagem da concentração de biomassa usando MSR .....	61
3.3 Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração de biomassa .....	64
3.4 Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a tensão superficial dos meios de biodegradação .....	64
3.5 Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação para AEO .....	65
3.6 Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a salinidade .....	67
<b>4. Discussão</b> .....	67
<b>5. Conclusão</b> .....	75
<b>6. Referências</b> .....	76
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	81
<b>Conclusão Geral</b> .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	83

## LISTA DE FIGURAS

- Fig.1 Melhores ensaios do planejamento fatorial completo  $2^4$ : (a) Ponto central, maior produção de biomassa, (b) Ensaio 4, maior redução de tensão superficial, (C) Ensaio maior atividade de emulsificação em pH 6 e (d) Ensaio 14, maior atividade de emulsificação em pH 14 60
- Fig 2 Superfícies de resposta para concentração de biomassa com 96h em função de: (a) pH e óleo diesel, (b) pH e sulfato de amônio, (c) pH e fosfato monobásico de potássio, (d) sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, (e) óleo diesel e sulfato de amônio e (f) óleo diesel e fosfato monobásico de potássio 63
- Fig. 3 Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para planejamento fatorial completo  $2^4$  tendo como variáveis independentes: (1) pH, (2) óleo diesel, (3) sulfato de amônio e (4) fosfato monobásico de potássio e como variáveis de resposta com 96h: (a) concentração de biomassa, (b) tensão superficial, (c) atividade de emulsificação para emulsão água em óleo de milho e (d) salinidade 66

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

Tabela 1. Desastres com hidrocarbonetos de petróleo e derivados, em ambientes marinhos, ocorridos no Brasil, entre os anos de 2000 e 2011.....	14
--	----

## CAPÍTULO II

Tabela 1. Níveis e valores dos fatores do planejamento fatorial completo $2^4$	56
Tabela 2. Composições dos meios de biodegradação e resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo $2^4$ com 96 h .....	58
Tabela 3. Identificação dos melhores meios para biodegradação de óleo diesel em água do mar .....	60
Tabela 4. Análise de variância para resultados do planejamento fatorial completo $2^4$ .....	61

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**BE** – Bioemulsificante

**BM** – Biomassa

**BS** – Biossurfactante

**AE** – Atividade de Emulsificação

**IE** – Índice de Emulsificação

**TS** – Tensão Superficial

**pH** – Potencial de Hidrogênio Iônico

**R/P** – Reserva/ Petróleo

**IPGN** – Indústria do Petróleo e Gás Natural

**BTEX** – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos

**UNEP** – United Nations Environment Programme

**USEPA** – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

## RESUMO

Metodologia de superfície de resposta foi usada para modelar a concentração de biomassa em processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988. A água do mar foi coletada em praia próxima ao Complexo Portuário de Suape, Pernambuco, Brasil. Um planejamento fatorial completo  $2^4$  foi realizado para investigar os efeitos e interações do pH e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração de biomassa, a tensão superficial, atividade de emulsificação, a salinidade e o pH em 96h. Vinte frascos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo os meios para biodegradação, foram incubados em agitador rotatório a 28° C e 200rpm por quatro dias. A levedura foi capaz de usar óleo diesel e produzir biossurfactantes e bioemulsificantes. As concentrações de biomassa variaram entre 7 e 36 g/L e as reduções das tensões superficiais entre 8 e 37%. Um modelo foi desenvolvido para concentração de biomassa em função do pH e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Um alto coeficiente de determinação ( $R^2=0,9544$ ) e um p-valor baixo ( $p<0,05$ ) garantem a significância estatística do modelo. A falta de ajuste não significativa ( $p>0,05$ ) sugere a adequação do modelo para explicar dados nas condições estudadas.

**Palavras-chave:** Metodologia de superfície de resposta; Biodegradação; Óleo diesel; Biossurfactante; Biorremediação marinha.

## ABSTRACT

Response surface methodology was used to model the concentration of biomass in the process of diesel oil biodegradation in sea water by *Candida lipolytica* CPU 0988. The seawater was collected from beach near Suape's industrial port complex, Pernambuco, Brazil. A 2<sup>4</sup> full factorial design was carried out to evaluate the effects and interactions of initial pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and monobasic potassium phosphate on biomass concentration, surface tension, emulsification activity, salinity and pH at 96h. Twenty 1000 mL Erlenmeyer flasks containing the media for biodegradation were incubated on a rotatory shaker at 28°C and 200 rpm for four days. The yeast was able to use diesel oil and to produce biosurfactants and bioemulsifiers. The biomass concentrations varied between 7 and 36 g/L and the surface tension reductions between 8 and 37%. A biomass concentration model was developed as a function of pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and monobasic potassium. A high coefficient of determination ( $R^2=0.9544$ ) and a low p-value ( $p < 0.05$ ) confirm the statistical significance of the model. The non-significant lack-of-fit value ( $p > 0.05$ ) suggests the adequacy of the biomass model to explain data in the studied conditions.

**Keywords:** Response surface methodology; Biodegradation; Diesel oil; Biosurfactant; Marine bioremediation.

# Capítulo 1

## Introdução

Produtos petrolíferos são amplamente usados em todo o mundo e seu uso intensivo está fortemente ligado a descargas antropogênicas de hidrocarbonetos no meio ambiente (WINKELMANN et al, 2009). Contaminação ambiental por derivados de petróleo tem sido objeto de estudo ao longo das últimas décadas. O vazamento destes derivados é capaz de prejudicar o meio ambiente, em muitos aspectos. Poluição por hidrocarbonetos nos ecossistemas marinhos tem efeitos potencialmente perigosos sobre o organismo e a saúde humana, devido à bioacumulação e bioaugmentação através das cadeias alimentares. A maioria dos compostos de hidrocarbonetos de petróleo (isto é, saturados, aromáticos) sofre biodegradação em diferentes taxas, e alguns componentes que são recalcitrantes podem ser metabolizados durante longos períodos de tempo. Estratégias de biorremediação tentam melhorar e acelerar este processo (ATLAS,1995ab).

O óleo diesel e a gasolina são os combustíveis mais vendidos no mundo. Vazamentos de óleodiesel de tanques de armazenamento subterrâneos, instalações de distribuição e de várias operações industriais representam uma importante fonte de contaminação do solo e do aquífero. Este combustível é uma mistura complexa de alcanos normais e ramificados e cíclicos, e compostos aromáticos obtidos a partir da fração de destilados médios, durante o processamento de petróleo.

A capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias e fungos. Eles podem ser encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Os micro-organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente, de forma que é requerida uma mistura de populações com capacidade enzimática ampliada para a degradação de hidrocarbonetos complexos encontrados no petróleo existente no solo, em água doce e em água do mar (MOHANTY & MUKHERJY, 2008).

Grandes quantidades de petróleo têm sido introduzidas nos oceanos por milhões de anos e um grupo diverso de micro-organismos tem evoluído para aproveitar esta rica fonte de carbono (BÜCKER, 2009).

Poluição por hidrocarbonetos no ambiente marinho ocorre principalmente devido a rotina de operações marítimas, efluentes refinarias de petróleo costeiras, eliminação de resíduos industriais e urbanos, derramamentos de petróleo causados por acidentes com petroleiros e explosões de plataformas de petróleo *off-shore* (CLARK, 1986).

Várias bactérias, leveduras e fungos filamentosos desempenham um papel importante na degradação de hidrocarbonetos no ambiente marinho. Estudos preliminares sobre degradadores de petróleo em água do mar mostram que isolados de levedura, incluindo cepas de *Yarrowia lipolytica*, degradam hidrocarbonetos de petróleo bruto de forma muito eficiente, especialmente a fração alifática (NAGPAL, 2011).

Em ecossistemas aquáticos, dispersão e emulsificação do óleo em derrames de petróleo parecem ser pré-requisitos para a biodegradação rápida. Grandes massas de óleo, *tarballs*, ou alta concentração de óleo em ambiente sem repouso tendem a persistir por causa de baixas áreas superficiais disponíveis para a atividade microbiana (LEAHY & COHWEEL, 1990). Os biosurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, e apresentam baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidades altos, além de serem eficazes na recuperação de ecossistemas, acelerando a biodegradação dos hidrocarbonetos provenientes de vazamentos (BENTO et al, 2003).

Existe um grande número de relatos descrevendo as propriedades de culturas microbianas - puras e mistas - que são capazes de degradar e dispersar petróleo e derivados em água do mar. Destes estudos no mínimo, três generalizações tem emergido: (i) a capacidade dos micro-organismos degradarem significativamente óleo em água do mar é dependente da adição de uma fonte exógena de nitrogênio e fósforo; este requisito de adicionar compostos de nitrogênio e fósforo considera muito provavelmente a vagarosa decomposição do petróleo em mar aberto; (ii) alcanos normais de baixo peso molecular são degradados mais rapidamente em laboratório que em derramamentos em mar aberto; (iii) culturas mistas realizam degradação mais extensiva que culturas puras (HOROWITZ et al, 1975).

Entretanto, o desenvolvimento de consórcios eficazes para biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e derivados está diretamente relacionado às

especificidades e eficiências de biodegradação das culturas puras envolvidas nos consórcios. Diversos relatos sobre leveduras degradadoras de petróleo encontram-se disponíveis na literatura (HASSANSHAHIAN et al., 2012; WU et al. 2009; FERREIRA et al. 2012; FARAG & SOLIMAN, 2011). Pesquisas recentes realizadas com cultura puras de *C.lipolytica* UCP 0988 tem mostrado o potencial de crescimento e de produção de biossurfactantes/ bioemulsificantes desta levedura, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando como única fonte de carbono derivados de petróleo, como querosene (SILVA et al., 2011; SILVA, 2012) e óleo diesel (HENRIQUES et al., 2011; SOUZA, 2009).

Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma coleção de técnicas estatísticas para planejamento de experimentos, construção de modelos, avaliação dos efeitos dos fatores e busca por condições ótimas para variáveis respostas de bioprocessos (MYERS & MONTGOMERY, 1995; MYERS et al, 2009). Nas últimas décadas, MSR tem sido extensivamente aplicada na otimização de condições ambientais (nutricionais e/ou operacionais) de processos de produção de bioemulsificantes (ALBUQUERQUE, 2006;), de produção biossurfactantes (FONTES et al., 2010; KIRAN et al., 2010; LUNA et al., 2011) e de biodegradação de petróleo (MOHAJERI et. al., 2010ab, ZAHED et al., 2010abc; FERREIRA et al., 2012) e derivados, como óleo de motor, querosene (AGARRY et al., 2012) e óleo diesel (XIA et al., 2006; HUANG et al., 2008; XIA et al., 2012).

No presente trabalho, a habilidade da levedura *C. lipolytica* UCP 0988 utilizar/ degradar óleo diesel em água do mar, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, em condições ácidas ou de extrema alcalinidade foi investigada, através de um planejamento fatorial completo  $2^4$  associado a metodologia de superfície de resposta. Um modelo para estimar a concentração da biomassa em função do pH e das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio também foi desenvolvido, como primeira etapa de uma estratégia sequencial de otimização.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Otimizar processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Implementar a primeira etapa de uma estratégia sequencial para otimização da biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C. lipolytica* UCP 0988.
- Avaliar o potencial de produção de bioemulsificantes/ biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.
- Identificar as melhores condições (pH e concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) para biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988.
- Desenvolver um modelo para descrever o comportamento da concentração de biomassa em função do pH e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio usando planejamento fatorial completo  $2^4$  associado a metodologia de superfície de resposta.
- Analisar os efeitos e as interações do pH inicial e das concentrações iniciais de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração de biomassa, a tensão superficial, a atividade de emulsificação, o pH e a salinidade, com 96h, usando planejamento fatorial completo  $2^4$  associado a metodologia de superfície de resposta.

### 1.3. Revisão da Literatura

#### 1.3.1 Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos constituídos apenas por átomos de carbono e hidrogênio e geralmente são divididos em quatro grupos: parafinas, olefinas, acetilenos, naftenos e aromáticos. As parafinas normais ou alcanos apresentam cadeia hidrocarbônica aberta, linear e saturada (contendo ligações simples). As isoparafinas ou isoalcanos apresentam cadeia hidrocarbônica aberta, ramificada e saturada. As olefinas apresentam cadeia hidrocarbônica aberta e insaturada, contendo ligações duplas (alcenos). Os acetilenos apresentam cadeia hidrocarbônica aberta e insaturada, contendo ligações triplas (alcinos). Os naftenos ou cicloalcanos apresentam cadeia hidrocarbônica cíclica insaturada. Os aromáticos apresentam um ou mais anéis benzênicos (cadeia hidrocarbônica cíclica contendo seis átomos de carbonos e ligações simples e duplas alternadas). Os aromáticos com elevado ponto de ebulição e elevada massa molecular (40 a 60 átomos de carbono), encontram-se no estado sólido e são denominados de asfálticos.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) constituem um grupo de compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura molecular basicamente, carbono e hidrogênio, formando 2 ou mais anéis aromáticos condensados, com cinco ou seis átomos de carbonos, podendo estar ou não substituídos por radicais alquila ou conter heteroátomos. A partir da estrutura do HAP pode-se obter informações sobre o nível de degradação destes compostos, as prováveis fontes predominantes e o seu destino no meio ambiente (BARROSO, 2010).

Os hidrocarbonetos são substâncias que apresentam características apolares (hidrófobos), ou seja, não apresentam atração pela água. Os hidrocarbonetos mono aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - os BTEX) e os policíclicos aromáticos de baixo peso molecular (naftaleno) apresentam uma maior solubilidade na água, aumentando o risco de contaminação (LEMOS et al, 2008).

### 1.3.2 Petróleo

A palavra petróleo tem origem nas palavras latinas *petra* e *oleum* e significa óleo que nasce da pedra. O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que, associada a pequenas quantidades de nitrogênio, enxofre e oxigênio, se encontra sob forma gasosa, líquida ou sólida, em poros e fraturas, em geral de rochas sedimentares. Nos depósitos encontram-se também água salgada e uma mistura de gases responsáveis pela pressão que provoca a ascensão do petróleo através de poços perfurados. O petróleo líquido é também chamado óleo cru para distingui-lo do óleo refinado, produto comercial mais importante. O gás de petróleo (gás natural) é uma mistura de hidrocarbonetos leves, enquanto as formas semi-sólidas são compostas de hidrocarbonetos pesados. Embora de pouca utilização em estado natural, o petróleo, quando refinado, fornece combustíveis, lubrificantes, solventes, material de pavimentação e muitos outros produtos. Os combustíveis derivados do petróleo respondem por mais da metade do suprimento total de energia do mundo (Centro de Ensino e Pesquisa Aplicada, USP, 1999).

O petróleo é a principal reserva energética do mundo e assim continuará até que tenham exaurido as reservas mundiais. Sua composição é variável. Em média, o petróleo apresenta cerca de 30% de alcanos, 50% de ciclo-alcanos e 15% de aromáticos (BENTO, 2003). No seu estado bruto, o petróleo tem pouquíssimas aplicações, servindo quase que somente como óleo combustível, fazendo-se necessário o refino, o qual consiste numa série de beneficiamentos pelos quais passa o mineral bruto para a obtenção de determinados produtos. Esses beneficiamentos constituem uma série de etapas físicas e químicas de separação, onde ao final destas etapas obtêm-se as diversas frações do petróleo. A partir de então, cada fração é submetida a outra série de processos que fornecem os derivados finais. Portanto, refinar petróleo significa separar as frações desejadas, processá-las e industrializá-las, transformando-as em produtos comerciais, como lubrificantes, solventes, material de pavimentação, material para a fabricação de tecidos sintéticos, borracha sintética, sabões, detergentes, tintas, plásticos, medicamentos, inseticidas, fertilizantes, etc (TONIETTO, 2005).

### 1.3.3 Óleo diesel

O óleo diesel é um combustível de composição complexa, constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio, etc. Estes hidrocarbonetos, normalmente, apresentam ponto de ebulição entre 150 e 471°C e são constituídos de 8 a 40 átomos de carbono. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico (BAKER e HERSON, 1994; GALLEGO, 2001; PETROBRAS, 2012).

Produzido a partir da refinação do petróleo, o óleo diesel é formulado através da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto. As proporções destes componentes no óleo diesel são aquelas que permitem enquadrar o produto final dentro das especificações previamente definidas e que são necessárias para permitir um bom desempenho do produto, minimizando o desgaste dos motores e componentes e mantendo a emissão de poluentes, gerados na queima desse combustível, em níveis aceitáveis (ANENG, 2012).

É o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas, atendendo as necessidades dos consumidores e as mais avançadas tecnologias em motores e combustão (PETROBRAS, 2012).

É um excelente modelo para estudar a biodegradação de hidrocarbonetos, sendo uma substância constituída de uma variedade dessas moléculas, como parafina, olefinas, nafta e compostos aromáticos (SARKAR, 2005).

Alguns compostos orgânicos presentes na composição do óleo diesel são cientificamente comprovados como carcinogênicos. Dentre os BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico, podendo em exposições crônicas causar danos à medula óssea, leucemia e câncer de fígado (MARIANO, 2006).

#### 1.3.4. Biodiesel

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (monoésteres alquílicos), derivado de fontes renováveis como óleos vegetais ou gorduras animais, obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos. As propriedades físico-químicas do biodiesel (viscosidade, densidade) são similares às do diesel, podendo totalmente ou parcialmente substituir o combustível fóssil (MITRE, 2012).

#### 1.3.5. Mistura de Óleo Diesel e Biodiesel

As misturas de biodiesel e óleo diesel são designadas pela abreviação BX, onde X é a porcentagem de biodiesel adicionada à mistura. O biodiesel registrado na “Environment Protection Agency – EPA – USA” como combustível e como aditivo para combustíveis, pode ser usado puro a 100% (B100), em misturas diversas com o diesel de petróleo (B20), ou numa proporção baixa como aditivo de 1 a 5%.

Desde 2008, em função da Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005, todo óleo diesel nacional disponível ao consumidor final é acrescido de biodiesel. Em janeiro de 2005 alcançou-se a mistura de 5%. Essa mistura é denominada óleo diesel B5. O óleo diesel B5, além de corrigir a lubricidade do óleo diesel, reduz os níveis de emissão dos veículos. Quanto ao teor de enxofre, os combustíveis comercializados ao consumidor final, possuem 50 mg/kg de enxofre (S50), 500 mg/kg de enxofre (S500) e 1.800 mg/kg de enxofre (S1800). O óleo diesel para comercialização, além do biodiesel, recebe também aditivos em sua composição. Esses aditivos aprimoram algumas características, visando maior desempenho do combustível. Os aditivos, normalmente incorporados aos combustíveis, são antiespumantes, desemulsificantes, detergentes, dispersantes e inibidores de corrosão.

### 1.3.6. Surfactantes sintéticos

Surfactantes ou agentes tensoativos são moléculas anfifílicas, que se associam espontaneamente em solução aquosa, a partir de uma determinada concentração. Apresentam uma região apolar e outra polar, ou iônica, e podem ser divididos em neutros ou iônicos. Os tensoativos iônicos podem ser catiônicos ou aniônicos ou, ainda, anfóteros, quando ambas as cargas estão presentes no surfactante.

Em soluções diluídas as moléculas dos surfactantes apresentam-se dispersas, enquanto que em soluções mais concentradas organizam-se em agregados moleculares, que geralmente contêm de 50 a 100 moléculas, denominados micelas. A principal razão que leva os monômeros de surfactantes a se associarem sob a forma de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água. A concentração onde se inicia o processo de formação das micelas, micelização, é denominada concentração micelar crítica (cmc), que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. Surfactantes melhoram a solubilização e a remoção de contaminantes.

Os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, inclusive na indústria petrolífera, no tratamento de ambientes contaminados por hidrocarbonetos (BANAT, 1995; KIM et al., 2000). Surfactantes são ubíquos e em efluentes não tratados, certas classes de surfactantes podem estar presentes em concentrações suficientes para constituir problemas de toxicidade para organismos aquáticos. (PACWA-PŁOCINICZAK, 2011 ).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos sintéticos existentes (BANAT, 1995; NITSCHKE; PASTORE, 2002, CERQUEIRA,2011).

### 1.3.7. Biossurfactantes

Em qualquer sistema heterogêneo, fronteiras são de fundamental importância para o comportamento do sistema como um todo. Surfactantes são substâncias que adsorvem a e alteram as condições prevalentes nas interfaces. Micro-organismos estão frequentemente aderidos às superfícies e concentram nas interfaces. Portanto, não é surpresa que micro-organismos, com grande relação superfície-volume, produzam uma variedade de biossurfactantes. Estes podem ser divididos em moléculas de baixo peso molecular que reduzem as tensões superficial e interfacial eficientemente e polímeros de alto peso molecular que aderem fortemente a superfícies. Produzidos por uma larga variedade de micro-organismos, os biossurfactantes tem diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície. É portanto razoável assumir que diferentes grupos de biossurfactantes tenham diferentes papéis no crescimento dos micro-organismos produtores e que cada grupo provavelmente forneça vantagens em um particular nicho ecológico (RON; ROSENBERG, 2001).

Geralmente, a estrutura de um biossurfactante inclui uma molécula hidrofílica composta de amino-ácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, ou mono, di ou polissacarídeos. A porção hidrofóbica é frequentemente uma molécula de ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados ou compostos de peptídeos anfílicos ou hidrofóbicos. De acordo com a estrutura química, os biossurfactantes podem ser classificados como: glicolipídeos, fosfolipídeos, biossurfactantes poliméricos e lipopeptídeos (BANAT, 1995).

Biossurfactantes são importantes agentes biotecnológicos com diversas aplicações industriais. Suas propriedades de interesse são: (i) fenômenos de mudança de superfície ativa, como reduções de tensões superficial e interfacial; (ii) ações de penetração e molhamento; (iii) espalhamento; (iv) ações de hidrofiliicidade e hidrofobicidade; (v) melhoramento do crescimento microbiano (vi) sequestro de metal e (vii) ação antimicrobiana. São muitas as vantagens apresentadas pelos biossurfactantes em relação aos surfactantes de origem sintética: alta biodegradabilidade; baixa toxicidade; biocompatibilidade e biodigestibilidade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos;

possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais; especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos; eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade; uso em biorremediação de locais impactados por petróleo e biodegradação e detoxificação de efluentes industriais (KOSARIC, 2001).

Muitas funções diferentes foram atribuídas aos surfactantes produzidos por micro-organismos; um das quais é seu envolvimento no metabolismo de substratos hidrofóbicos. Biosurfactantes aumentam a biodisponibilidade de hidrocarbonetos resultando em melhora do crescimento e degradação dos contaminantes por micro-organismos biodegradadores de hidrocarbonetos presentes no ambiente poluído (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). A habilidade de biosurfactantes para emulsificar misturas hidrocarbonetos-em-água tem sido muito bem documentada. Esta propriedade tem mostrado aumentar a degradação de hidrocarbonetos significativamente, sendo assim potencialmente útil para gerenciamento de derramamentos de óleo.

Em ambientes aquosos, a atividade interfacial de biosurfactantes e bioemulsificantes pode tornar substratos, como hidrocarbonetos, mais passíveis a atividade de micro-organismos degradadores. Entretanto, nem todos os micro-organismos que utilizam substratos hidrofóbicos são produtores de biosurfactantes. Portanto, seria plausível perguntar se a adição de biosurfactante ao meio ambiente de um não-produtor poderia melhorar a capacidade desse organismo de degradar um substrato hidrofóbico. Uma situação óbvia em que isso poderia ser vantajoso seria no campo da biorremediação, particularmente na biorremediação *in situ*. Os mecanismos envolvidos nas interações entre biosurfactantes ou células microbianas e hidrocarbonetos imiscíveis incluem: (i) emulsificação; (ii) adesão/desprendimento de micro-organismos aos hidrocarbonetos; (iii) micelização; e (iv) dessorção de contaminantes; todos os quais são esperados aumentar as taxas de remediação biodegradativa. A literatura geralmente apoia tais conclusões, no entanto, alguns casos em que interações complexas entre células microbianas, substratos orgânicos, compostos tensoativos e seu ambiente, levam à inibição da biodegradação, também foram relatados (BANAT, 2012).

### 1.3.8. Poluição de mares e oceanos por hidrocarbonetos

Poluição marinha tem se tornado uma preocupação global sempre que os níveis de contaminantes em mares e oceanos aumentam em uma larga extensão, como consequência de atividades antropogênicas. Muitas áreas costeiras no mundo têm relatado ter tido prejuízo devido a poluição, afetando significativamente recursos marinhos. O ambiente marinho recebe diariamente HPA liberados de diversas fontes, como efluentes industriais e domésticos, deposição atmosférica, escoamento superficial e subterrâneo, que se distribuem por toda a coluna d'água e sedimentos (HARVEY, 1997).

A indústria petrolífera constitui um constante ameaça ao ambiente como consequência do grande influxo de hidrocarbonetos de petróleo introduzidos em ecossistemas marinhos. A introdução de poluentes de petróleo em ambientes oceânicos tem sido estimada em milhões de toneladas (HUANG et al., 2008).

Vazamentos e derrames acidentais ou intencionais são frequentes, durante a exploração, produção, refino, transporte e estocagem de petróleo e seus derivados. O derramamento intencional de 240 milhões de galões de petróleo bruto no Golfo do Pérsico, em 1991, durante a Guerra do Kuwait é considerado o maior desastre ambiental da história. A mancha de óleo se espalhou por 700 quilômetros de costa, provocando danos irreparáveis aos ecossistemas e populações do Golfo. O maior desastre acidental deste século, ocorreu em 20 de abril de 2010, quando um vazamento de gás provocou a explosão da plataforma de exploração *Deepwater Horizon*, da empresa petrolífera *British Petroleum*. A plataforma explodiu a 1500 metros abaixo da superfície do oceano e a 6,4 quilômetros de distância da costa do estado norte-americano de Louisiana, no Golfo do México. O acidente matou 11 das 126 pessoas que estavam na plataforma e causou o vazamento de aproximadamente 206 milhões de galões de petróleo no oceano. A mancha de óleo atingiu mais de mil quilômetros da região costeira, prejudicando os ecossistemas marinhos e as populações litorâneas locais.

A tabela 1 apresenta, cronologicamente, os principais acidentes com petróleo e derivados, ocorridos no Brasil, em ambientes marinhos, entre os anos 2000 e 2011.

Tabela 1 – Desastres com hidrocarbonetos de petróleo e derivados, em ambientes marinhos, ocorridos no Brasil, entre os anos de 2000 e 2011.

Quando?	Onde?	Quantos litros?	Como?
Jan 2000	Baía de Guanabara, Rio de Janeiro	1.300.000	O rompimento de um duto da Petrobras que liga a Refinaria Duque de Caxias ao terminal da Ilha d'Água provocou o vazamento de óleo combustível. A mancha se espalhou por 40 quilômetros quadrados.
Mar 2000	Tramandaí, Rio Grande do Sul	18.000	O rompimento de uma conexão de borracha do sistema de transferência de combustível de um navio petroleiro para o Terminal Almirante Soares Dutra, da Petrobras causou o acidente no litoral gaúcho, provocando uma mancha de cerca de três quilômetros na Praia de Jardim do Éden.
Mar 2000	Canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo	7.250	O navio Mafra, da Frota Nacional de Petróleo, derramou óleo no canal. O produto transbordou do tanque de reserva de resíduos oleosos, situado no lado esquerdo da popa.
Jun 2000	Baía de Guanabara, Rio de Janeiro	380	O navio Cantagalo, que prestava serviços à Petrobras lançou óleo combustível ao mar. O despejo ocorreu numa manobra para deslastreamento da embarcação. A mancha de óleo de um quilômetro de extensão apareceu próximo à Ilha d'Água.
Nov 2000	São Sebastião e Ilhabela – S. Paulo	86.000	Um vazamento de óleo de um navio cargueiro da Petrobras poluiu as praias de São Sebastião e de Ilhabela.
Ago 2001	Costa do Sauípe, Bahia		Um vazamento de óleo leve, de origem árabe, no litoral norte baiano, atingiu 30 quilômetros nas praias entre as localidades de Buraquinho e o balneário da Costa do Sauípe.
Ago 2001	Angra dos Reis, Rio de Janeiro	715	Um vazamento de petróleo do navio <i>Princess Marino</i> na Baía de Ilha de Grande.
Out 2001	São Francisco do Sul, Santa Catarina	150	Um vazamento de óleo de um navio que descarregava petróleo na monobóia, a 8 km da costa, atingiu o litoral norte de Santa Catarina.
Out 2001	Baía de Paranaguá, Paraná	392.000	O navio petroleiro Norma que carregava nafta, da frota da Transpetro - subsidiário da Petrobras, chocou-se em uma pedra na baía, provocando vazamento que atingiu uma área de 3 mil metros quadrados, no litoral paranaense.
Fev 2002	Baía de Guanabara, Rio de Janeiro	50.000	Um vazamento de óleo combustível do transatlântico inglês Caronia, atracado no pier da Praça Mauá. O óleo foi rapidamente contido.
Mai 2002	Angra dos Reis, Rio de Janeiro	16.000	O navio Brotas da Transpetro, subsidiária de transportes da Petrobras, derramou de petróleo leve (do tipo nigeriano), na baía de Ilha Grande. O vazamento foi provocado provavelmente por corrosão no casco do navio, que estava ancorado armazenando um tipo de petróleo leve, de fácil evaporação.
Ago 2002	São Sebastião, São Paulo	3.000	Um problema no equipamento de carregamento de óleo de um navio de bandeira grega provocou o despejo do petróleo no mar, do litoral norte paulista.
Nov 2004	Baía de Paranaguá, Paraná	5.000.000	O cargueiro chileno Vicuña explodiu no porto de Paranaguá. Quatro tripulantes dos 24 que estavam a bordo morreram e cerca de um milhão de litros de metanol e cinco milhões de litros de óleo combustível vazaram no mar. Destes, apenas foram recuperados cerca de 1,2 milhões de litros de óleo e 2,3 milhões de litros de água oleosa. Centenas de animais- incluindo crustáceos, golfinhos, tartarugas e aves aquáticas- foram encontradas mortas na região. O acidente foi considerado, o maior vazamento em 20 anos, na Baía.
Nov 2011	Bacia de Campos, Macaé, Rio de Janeiro	588.000	Um poço de petróleo da empresa americana Chevron, em Campo do Frade, foi o responsável pelo vazamento 3.700 barris de petróleo no mar. O acidente aconteceu a 120 quilômetros da costa do Rio de Janeiro e produziu uma mancha de óleo que alcançou 18 quilômetros de extensão. Foram sete fissuras no poço e o acidente só foi detectado dois dias depois. No total, foram seis dias para conter o vazamento. As investigações apontaram 25 falhas da Chevron, incluindo descumprimento das regulamentações, e concluíram que o acidente poderia ter sido evitado. A empresa foi multada em R\$ 50 milhões pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama).

Fonte: Adaptado de Biomania, 2011.

### 1.3.9. Biorremediação microbiana

Métodos mecânicos (e.g. escumadeira) e químicos (e.g. surfactantes e dispersantes) de remediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e derivados são caros e limitados em efetividade. A aplicação de micro-organismos para decompor poluentes de petróleo tem mostrado ser uma alternativa tecnológica promissora (HUANG et al., 2008).

Biorremediação microbiana se refere a restauração do local poluído através da remoção dos contaminantes orgânicos por micro-organismos (bactérias, fungos, leveduras ou suas enzimas). É um processo que explora a versatilidade metabólica natural dos micro-organismos para degradar contaminantes ambientais. Geralmente, a biorremediação envolve estimulação de populações microbianas endógenas por meio de modificações ambientais (bioestímulo) ou introdução de população microbiana exógena - formada por degradadores conhecidos - ao local contaminado (bioaumento). A biorremediação oferece várias vantagens como destruição de contaminantes, baixo custo de treinamento e menos perturbação ambiental. Possui grande aplicabilidade e sua otimização depende, entre outros fatores, das condições ambientais, do tipo de contaminante e da técnica empregada. A biorremediação é denominada *in situ*, quando o tratamento do material contaminado é realizado no local de origem, ou *ex situ*, quando há remoção do material contaminado para tratamento em outro local.

O sucesso do processo de biorremediação *in situ*, usando bioaumento, depende do emprego de culturas adequadas às condições biológicas e físico-químicas do local impactado e que atuem em sinergia com as espécies indígenas do local, não interferindo, assim, nos processos químicos naturais. Dessa forma, a seleção de micro-organismos autóctones da região contaminada pode levar a um processo de biorremediação rápido e eficiente (BENTO, 2003).

Entre as técnicas mais utilizadas em processos de biorremediação *ex-situ* encontra-se a de tratamento em biorreatores. Como vantagens desta técnica podem ser citadas: promoção de um maior contato dos micro-organismos com os poluentes, nutrientes e oxigênio; (SANTOS, 2002), flexibilidade de configuração e controle automático rigoroso dos fatores abióticos. O custo do biorreator pode ser visto como

uma desvantagem compensada pela redução do tempo de tratamento e pela diminuição de mão de obra.

As estratégias de tratamento biológico a serem implementadas no tratamento de ambientes aquáticos contaminados por óleo diesel devem levar em conta a quantidade de contaminante, a capacidade de biodegradação da cultura a ser utilizada e o tipo de tratamento biológico, aeróbio ou anaeróbio. A seleção da tecnologia mais adequada considera a relação custo/benefício e o tempo de tratamento

Um método promissor que pode melhorar a eficácia da biorremediação dos ambientes contaminados com hidrocarbonetos é o uso de biossurfactantes. Eles podem melhorar a biorremediação de hidrocarbonetos por dois mecanismos. O primeiro inclui o aumento da biodisponibilidade do substrato para micro-organismos, enquanto o outro envolve a interação com a superfície celular, o que aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos se associem mais facilmente às células bacterianas. Ao reduzir as tensões superficiais e interfaciais, os biossurfactantes aumentam as áreas superficiais de compostos insolúveis, levando a maior mobilidade e biodisponibilidade de hidrocarbonetos. Em consequência, os biossurfactantes aumentam a biodegradação e remoção de hidrocarbonetos. Podendo ser esperado que a adição de biossurfactantes melhore a biodegradação de hidrocarbonetos por mobilização, solubilização ou emulsificação.

A biorremediação possui grande aplicabilidade e tem sua eficiência comprovada na remoção dos diversos tipos de contaminantes. No entanto, é importante ressaltar que a otimização do processo de biorremediação depende de estudos minuciosos quanto às condições ambientais, o tipo de contaminante e a técnica empregada (PEREIRA & LEMOS, 2003, MENEGHETTI, 2007).

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.

### 1.3.10. Biodegradação

Depois de um derramamento de óleo, os hidrocarbonetos sofrem certos processos físico-químicos na natureza, tais como evaporação e oxidação fotoquímica que mudam a composição do óleo. Entretanto, o mais importante processo é a biodegradação. A degradação microbiana é o principal e último mecanismo natural pelo qual se pode limpar hidrocarbonetos de petróleo do ambiente. A biodegradação microbiana de hidrocarbonetos consiste em reações de oxidação-redução, nas quais os hidrocarbonetos são oxidados na presença de aceptores terminais de elétrons como oxigênio, nitrato, ferro III, sulfato e dióxido de carbono. As vias utilizadas na degradação são determinadas pelo modo de obtenção de energia dos micro-organismos, podendo ser aeróbias e anaeróbias. O processo aeróbico utiliza o oxigênio comoceptor final de elétrons e origina como produtos, dióxido de carbono, água e biomassa celular. Na degradação anaeróbica, os aceptores finais de elétrons são outros elementos químicos como: nitrato, manganês, íon de ferro III dióxido de carbono. A degradação aeróbica é um processo mais rápido e eficiente na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos. A complexidade dos processos metabólicos necessários para degradação leva à formação de consórcios, incluindo bactérias e fungos de diferentes gêneros e espécies, onde cada micro-organismo é especializado em degradar uma ou várias substâncias contaminantes como, hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos e policíclicos (MARGESIN; SCHINNER, 2001).

Muitos micro-organismos possuem capacidade enzimática para biodegradar hidrocarbonetos. Alguns micro-organismos degradam alcanos, outros aromáticos e outros são capazes de degradar tanto alcanos como aromáticos. A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos já foi esclarecida. O passo inicial para biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular. Os alcanos geralmente são convertidos a ácidos carboxílicos que posteriormente são biodegradados pelo processo de  $\beta$ -oxidação. A biodegradação de compostos aromáticos requer uma reação de dihidroxilação com formação de dióis, seguida de clivagem do anel e a formação de catecol que posteriormente é degradado em

intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Os fungos formam trans-dióis e muitos deles são potentes carcinogênicos, enquanto bactérias quase sempre formam cis-dióis que não são biologicamente ativos. Outros mecanismos envolvidos são: (i) adesão de células microbianas aos substratos e (ii) produção de biossurfactantes. O mecanismo de absorção ligado a adesão da célula à gotícula de óleo é ainda desconhecido, mas a produção de biossurfactantes tem sido bem estudada (ATLAS, 1995).

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxirredução na qual o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e umceptor de elétrons é reduzido. Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, como o oxigênio ( $O_2$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), óxidos de ferro  $Fe(OH)_3$ , sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), água ( $H_2O$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). A seguinte sequência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água. Esta ordem reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidativos mais altos (MARIANO, 2006).

A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (OD) na água e o aumento da concentração de dióxido de carbono são indicativos de um processo aeróbio de biodegradação, enquanto que a produção de íons  $Fe^{2+}$  ou diminuição de íons nitrato indicam a presença de processos anaeróbios. Um declínio do potencial redox (Eh) de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos micro-organismos aeróbios) para condições redutoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios). Um aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons  $H^+$  durante a redução de íons férricos ou do nitrato (RÖLING e VERSEVEL, 2002).

A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, na qual os compostos químicos orgânicos são transformados em compostos químicos inorgânicos como dióxido de carbono, água e amônia; (b) biotransformação, na qual os compostos orgânicos químicos são transformados em estruturas menores e (c) cometabolismo, no qual outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico. A escolha de um método de tratamento vai depender das características físicas, físico-químicas e químicas do resíduo e da

disponibilidade de instalações para processar esses materiais (RON e ROSENBERG, 2001).

Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. O oxigênio é um co-substrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984). Em muitos casos, a maior limitação na biodegradação aeróbia em subsuperfície é a baixa solubilidade do oxigênio em água. Por exemplo, a mineralização aeróbia do tolueno ( $C_6H_5-CH_3$ ) é representada pela seguinte equação:



A água saturada com ar contém de 6 a 12 ppm de oxigênio dissolvido. Por exemplo, a completa conversão do tolueno (e muitos outros hidrocarbonetos) para  $CO_2$  e  $H_2O$  requer aproximadamente 3g de  $O_2$  por grama de hidrocarboneto. Usando-se essa taxa, o  $O_2$  presente na água pode resultar na biodegradação de 2 a 4 ppm de hidrocarboneto através de processo estritamente aeróbio. Se a concentração de hidrocarboneto for maior que essa, a biodegradação deve ser incompleta ou deve acontecer mais vagarosamente por processo anaeróbio. A extensão da biodegradação aeróbia é controlada pela quantidade de contaminantes, taxa de transferência de oxigênio para a subsuperfície e o conteúdo original de oxigênio na água.

O ambiente marinho recebe diariamente hidrocarbonetos liberados de diversas fontes, como efluentes industriais e domésticos, deposição atmosférica, escoamento superficial e subterrâneo, que se distribuem por toda a coluna d'água e sedimentos. Uma das principais classes de contaminantes são os hidrocarbonetos aromáticos, constituintes dos derivados do petróleo e produtos de combustão incompleta. São contaminantes persistentes no ambiente, devido a sua propriedade hidrofóbica e a baixa volatilidade dos compostos com alto peso molecular (HARVEY, 1997).

Os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xileno, orto, meta e para) são hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis que estão presentes em combustíveis como a gasolina e em menor quantidade no óleo diesel. Estes apresentam maior solubilidade

em água que os outros constituintes de combustíveis automotivos, sendo portanto de fundamental importância estudar a capacidade de micro-organismos promoverem a sua degradação, devido aos efeitos maléficos que podem causar à saúde humana (CORSEUIL, 2004). A habilidade de micro-organismos degradarem BTEX é conhecida desde 1908, quando Stormer isolou a bactéria *Bacillus hexabovorum*, que apresentou capacidade de crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno (PENNER, 2000).

Por outro lado, os HAP ao serem introduzidos no ambiente marinho, sofrem particionamento: os de baixo peso molecular, com maiores pressões de vapor, tendem a volatilizar (PAYNE et al., 1989). Os HPA menos voláteis e mais solúveis são adsorvidos ao material particulado e depositados no sedimento (CULLEN et al., 1994), onde podem sofrer modificações químicas e bioquímicas muito lentas (PAYNE et al., 1989; OLIVER, 1988; HARITASH; KAUSHIK, 2009), além de poderem ser disponibilizados para a coluna d'água e, conseqüentemente, para a biota (BARROSO, 2010).

Em geral, a biodegradabilidade dos HAP é inversamente proporcional ao número de anéis benzênicos condensados (CERNIGLIA; HEITCAMP, 1989). A persistência de HAP de alto peso molecular é devido largamente a sua baixa solubilidade em água e a energia de ressonância de suas estruturas (CERNIGLIA, 1992). A degradação dos HAP no ambiente pode ocorrer através de processos químicos e físicos. A interação entre moléculas e íons ou a excitação de átomos por efeito da luz e da temperatura conduzem a desestabilização da estrutura das moléculas e ao rompimento das ligações. No entanto, estes processos são lentos e incompletos (CAMARGO, 2007).

A utilização de micro-organismos degradadores é uma alternativa para eliminação dos HAP do ambiente. Para isso, além da seleção dos micro-organismos com comprovada capacidade de degradação destes compostos, faz-se necessário fornecer condições adequadas de disponibilidade de água, nutrientes inorgânicos, pH e temperatura (JACQUES, 2007).

### 1.3.11. Fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos

A persistência de compostos poluentes depende da quantidade e qualidade da mistura dos hidrocarbonetos e das propriedades do ecossistema afetado. Em um determinado ambiente, os hidrocarbonetos do petróleo podem persistir indefinidamente, enquanto sob outras condições os mesmos hidrocarbonetos podem ser completamente degradados em algumas horas ou dias. Em geral, fatores que influenciam as taxas de crescimento microbiano e de atividade enzimática afetam a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos. (ATLAS, 1981).

De acordo com ampla revisão de trabalhos anteriores (ATLAS; BARTH, 1973; CERNIGLIA e GIBSON, 1977, entre outros) realizada por Leahy e Colwell (1990) - e ratificada, posteriormente, por diversos pesquisadores (MACGILLIVARY; SHIARIS, 1993; CERNIGLIA et al., 1997, SARKAR et al., 2005; CHIKERE et al., 2011; TYAGI, 2011, entre outros) - os fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente podem ser classificados em físico-químicos e biológicos, sendo os principais apresentados a seguir.

#### ***Fatores físico-químicos***

##### *Composição química do óleo ou hidrocarbonetos*

Os hidrocarbonetos diferem em sua susceptibilidade ao ataque microbiano e têm geralmente sido classificados na seguinte ordem de susceptibilidade decrescente: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos. As taxas de biodegradação têm mostrado ser mais elevadas para os hidrocarbonetos saturados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos leves, com hidrocarbonetos aromáticos de alto peso molecular e compostos polares exibindo taxas de degradação extremamente baixas. Este padrão não é universal. A heterogeneidade da composição dos diferentes tipos de petróleo bruto e produtos refinados influencia a taxa global de biodegradação, de ambos, do petróleo e suas frações componentes.

##### *Estado físico do petróleo ou hidrocarbonetos*

Em mares e oceanos, o óleo derramado na água tende a se espalhar e formar uma mancha. Como resultado do vento e da ação das ondas, emulsões óleo em-água ou água-em-óleo podem ser formadas. A dispersão de hidrocarbonetos na coluna de água na forma de emulsões óleo-em-água aumenta a área superficial do óleo e, portanto, sua disponibilidade ao ataque microbiano. Entretanto, grandes massas de *mousse* estabelecem relações superfície-para-volume desfavoravelmente baixas. Bolas de alcatrão (ou piche), que são grandes agregados de óleo intemperizado e não degradado, também restringem o acesso por micro-organismos devido a sua limitada área superficial. A formação de emulsões através da produção microbiana e liberação de biossurfactantes é um processo importante na absorção de hidrocarbonetos por bactérias e fungos.

### *Concentração de Óleo ou Hidrocarbonetos*

As taxas de absorção e mineralização de muitos compostos orgânicos por populações microbianas no meio aquático são proporcionais à concentração do composto. As altas concentrações de hidrocarbonetos podem ser associadas a manchas de óleo pesadas e não dispersas na água, causando a inibição da biodegradação por limitação de nutrientes ou oxigênio ou através de efeitos tóxicos exercidos por hidrocarbonetos voláteis.

### *Temperatura*

A temperatura influencia a biodegradação do petróleo pelo seu efeito na natureza física e na composição química do óleo, na taxa de metabolismo de hidrocarbonetos por micro-organismos e na composição da comunidade microbiana. Em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização dos alcanos tóxicos de cadeia curta é reduzida, e a sua solubilidade em água aumenta, atrasando o início da biodegradação. As taxas de degradação geralmente diminuem com a diminuição da temperatura; provavelmente devido a redução das taxas de atividade

enzimática. Temperaturas mais altas aumentam as taxas de metabolismo de hidrocarbonetos para um máximo, tipicamente na faixa de 30 a 40 ° C, acima do qual a toxicidade da membrana dos hidrocarbonetos é aumentada.

### *Oxigênio*

Os passos iniciais no catabolismo de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos por bactérias e fungos envolvem a oxidação do substrato por oxigenases, para as quais é necessário oxigênio molecular. As condições aeróbicas são, portanto, necessárias para esta via de oxidação microbiana de hidrocarbonetos no meio ambiente. As condições de limitação de oxigênio normalmente não existem nos níveis superiores da coluna de água em ambientes marinhos e de água doce. Os sedimentos aquáticos, no entanto, são geralmente anóxicos, exceto por uma camada fina na superfície do sedimento. Alguns estudos têm mostrado, que a degradação anaeróbica de hidrocarbonetos de petróleo por micro-organismos ocorre apenas em taxas negligenciáveis - e seu significado ecológico tem sido geralmente considerado menor.

### *Nutrientes*

A liberação de hidrocarbonetos para ambientes aquáticos que contêm baixas concentrações de nutrientes inorgânicos, muitas vezes, produz taxas excessivamente altas de carbono/nitrogênio ou carbono/fósforo, ou ambas, que são desfavoráveis para o crescimento microbiano. Está bem estabelecido que a disponibilidade de nitrogênio e fósforo limita a degradação microbiana de hidrocarbonetos em água e sedimento estuarino, água do mar, sedimento marinho, lagos de água doce, lagoas árticas, sedimentos de água doce e águas subterrâneas. Nutrientes como nitrogênio, fósforo e, em alguns casos, ferro são ingredientes importantes para a biodegradação bem sucedida de poluentes de hidrocarbonetos. Portanto, em muitos casos, as adições de nutrientes tornam-se necessárias para melhorar a biodegradação do óleo poluente. Contudo, concentrações excessivas de nutrientes também podem inibir a atividade de biodegradação.

## *Salinidade*

Existem poucos estudos que tratam dos efeitos da **salinidade** sobre a biodegradação de hidrocarbonetos. Em geral, muitos isolados de solo, água doce e estuários podem sobreviver em salinidades comparáveis a salinidade da água do mar (3,5% em massa). Entretanto, poucas espécies de água doce ou terrestres são capazes de reproduzir em água do mar. Devido aos requisitos de salinidade, isolados marinhos crescem pobremente em salinidades menores que 1 a 2%. A reduzida capacidade para biodegradação em nichos hipersalinos deve ser atribuída mais a redução geral na atividade microbiana associada com ambientes extremos que aos efeitos da salinidade sobre os hidrocarbonetos (WARD; BROCK, 1978; LEAHY; COLWELL, 1990; BERTRAND, 1993; SARKAR et al., 2005).

## *pH*

Extremos de **pH** são inibitórios para a grande maioria dos processos de biodegradação de hidrocarbonetos. A maioria dos fungos é menos afetada por pH baixos que as bactérias. As taxas de biodegradação são mais altas em pH próximos a neutralidade. Para a maioria das espécies, o pH ótimo é ligeiramente alcalino, ou seja, pouco maior que 7. (BARTH, 1997; ALEXANDER, 1980; LEAHY; COLWELL; 1990; PEDROZO, 2002; SARKAR et al., 2005). Normalmente, o pH diminui durante a biodegradação devido a produção de metabólitos ácidos e gás carbônico, podendo provocar diminuição da atividade microbiana. O pH da água do mar varia entre 7,4 e 8,4, com média aproximadamente 7,6.

## ***Fatores biológicos***

### *Degradação microbiana de hidrocarbonetos*

Os hidrocarbonetos no ambiente são biodegradados inicialmente pelas bactérias e fungos. Embora ubíqua nos ecossistemas terrestres e aquáticos, a fração da

comunidade heterotrófica total representada pelas bactérias e fungos que utilizam hidrocarbonetos é altamente variável. Culturas de um mesmo tipo de micro-organismo (culturas puras) podem metabolizar apenas uma gama limitada de substratos de hidrocarbonetos, de modo que a montagem de populações de micro-organismos de diferentes tipos (formação de consórcios microbianos) com capacidades enzimáticas amplas gerais são necessárias para degradar misturas complexas de hidrocarbonetos, como o petróleo bruto no solo, água doce e ambientes marinhos. A extensão em que bactérias, leveduras e fungos filamentosos participam da biodegradação de hidrocarbonetos tem sido objeto de estudo limitado, mas parece ser uma função do ecossistema e condições ambientais locais. No meio marinho, as bactérias geralmente são consideradas como representando o elemento predominante de degradação de hidrocarbonetos da comunidade microbiana.

#### *Adaptação - Efeito da exposição prévia a hidrocarbonetos*

A exposição prévia de uma comunidade microbiana a hidrocarbonetos - seja de fontes antropogênicas, como derrames acidentais de petróleo, atividades de exploração e transporte de petróleo e descarte de óleos usados, ou de fontes naturais, como infiltrações e hidrocarbonetos derivados de plantas - é importante na determinação da rapidez com que os as entradas subsequentes de hidrocarbonetos podem ser biodegradadas. Este fenômeno, que resulta de aumentos no potencial de oxidação de hidrocarbonetos da comunidade, é conhecido como adaptação. Os três mecanismos inter-relacionados pelos quais a adaptação pode ocorrer são: (i) indução e/ou depressão de enzimas específicas, (ii) mudanças genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas e (iii) enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar o composto ou compostos de interesse.

#### *Adaptação por alteração da composição genética da comunidade microbiana*

O mecanismo genético primário para a adaptação da comunidade microbiana é a amplificação de genes envolvidos no metabolismo do contaminante químico, por

meio de enriquecimento seletivo e transferência e mutação de genes. O monitoramento direto deste processo em relação à adaptação aos hidrocarbonetos foi possível devido ao desenvolvimento de sondas de DNA específicas para os genes que codificam as rotas catabólicas de hidrocarbonetos.

### *Papel dos plasmídeos na adaptação*

O DNA de plasmídeo pode desempenhar um papel particularmente importante na adaptação genética na medida em que representa uma forma de DNA altamente móvel que pode ser transferida através de conjugação ou transformação e pode conferir novos fenótipos, incluindo a capacidade de oxidação de hidrocarbonetos, aos organismos receptores. A exposição de populações microbianas naturais ao petróleo ou outros hidrocarbonetos pode impor uma vantagem seletiva às cepas que possuem plasmídeos que codificam enzimas para o catabolismo de hidrocarbonetos, resultando em um aumento geral da frequência do plasmídeo na comunidade.

### *Bioaumentação (semeadura)*

O bioaumentação envolve a introdução de micro-organismos alóctones no ambiente natural com o objetivo de aumentar a taxa ou extensão, ou ambos, da biodegradação de poluentes. O raciocínio para esta abordagem é que as populações microbianas autóctones podem não ser capazes de degradar a ampla gama de substratos potenciais presentes em misturas complexas como o petróleo. Os critérios a serem cumpridos pelo micro-organismo inoculado incluem a capacidade de degradar a maioria dos componentes do petróleo, estabilidade genética, viabilidade durante o armazenamento, crescimento rápido após armazenamento, alto grau de atividade enzimática e crescimento no meio ambiente, a capacidade de competir com micro-organismos indígenas, não patogenicidade e a incapacidade de produzir metabólitos tóxicos. As culturas mistas têm sido mais comumente usadas como inóculos para o bioaumentação por causa da facilidade relativa com a qual os micro-organismos com

capacidades diferentes e complementares de degradação de hidrocarbonetos podem ser isolados.

### 1.3.12 Micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos

Os micro-organismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone capaz de degradar hidrocarbonetos (micro-organismos hidrocarbonoclásticos) (KATAOKA, 2001). Micro-organismos degradadores de petróleo têm sido encontrados em diversos *habitats* como na areia da praia (SANTOS, 2002), em solos contaminados por petróleo, em margem de lagoa (SOUZA et al.,2005) e na água do mar (SOUZA, 2005), entre outros.

Os primeiros estudos da utilização de hidrocarbonetos por micro-organismos foram realizados por Sohnger e Kaserer, em 1906 (BUSHNELL e HAAS, 1941). Em 1913, Sohnger relatou que gasolina, querosene, parafina e óleo de parafina poderiam ser oxidados a CO<sub>2</sub>, água e traços de ácidos orgânicos por micro-organismos pertencentes, principalmente, aos gêneros *Mycobacterium* e *Pseudomonas*. Gray e Thornton (1928) isolaram vários organismos capazes de decompor compostos aromáticos como naftaleno, tolueno, cresol e fenol pertencentes aos seguintes gêneros: *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Bacterium*, *Bacillus* e *Spirillum*. A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de micro-organismos, pois, vários grupos de bactérias, fungos e actinomicetos têm mostrado possuir essa capacidade (KATAOKA, 2001).

Gutnick e Rosenberg (1977) postularam três características essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos micro-organismos: (i) um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos com sítios especiais de ligação e/ou produção de substâncias emulsificantes para o transporte do hidrocarboneto ao interior da célula; (ii) enzimas oxigenases específicas e (iii) especificidade induzida – resposta positiva do organismo ao hidrocarboneto.

Segundo Morgan e Watkinson (1994), os hidrocarbonetos podem ser metabolizados por muitos gêneros de bactérias, fungos filamentosos e leveduras e até mesmo por algas unicelulares. Essa habilidade de degradar hidrocarbonetos como

substrato já foi observada em uma grande variedade de gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Nocardia*) e fungos (*Penicillium*, *Cunninghamella*, *Aspergillus*, *Syncephalastrum*, *Geotrichum*). As bactérias constituem os microrganismos mais estudados, dentre os quais as *Pseudomonas* foram as primeiras a serem colocadas em evidência em função da sua capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP).

Em ambientes marinhos, biodegradação de hidrocarbonetos é largamente realizada por diferentes populações bacterianas, que são ubiquamente distribuídas nos oceanos. Os mais comumente gêneros de biodegradadores de petróleo relatados incluem *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Vibrio* e *Achromobacter* (FLOODGATE, 1984). De acordo com Cerniglia (1992) a maioria das bactérias do gênero *Pseudomonas* apresenta importante papel na degradação de hidrocarbonetos de petróleo. A habilidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos ocorre principalmente em duas ordens: Mucorales e Moniliales. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo, esta característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (GRADY, 1985).

Ao contrário das bactérias e leveduras que mostram decréscimo na capacidade de degradação de alcanos com o aumento da cadeia do composto, os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa. Entretanto, o metabolismo dos fungos geralmente resulta numa degradação incompleta que necessita da associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do composto (RISER-ROBERTS, 1992; LEE, 2005). Komagata et al. (1964) examinaram cerca de 500 espécies de leveduras quanto à habilidade de utilizar hidrocarbonetos e constataram que 56 espécies possuíam capacidade de degradar, sendo que a maioria delas pertencia ao gênero *Candida*.

Em geral, processos de biodegradação realizados com cultura mista, apresentam vantagens sobre os realizados com cultura pura. Em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por outra espécie e o ataque de outros microorganismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da

comunidade não exista um micro-organismo capaz de degradá-lo totalmente (BUSHNELL e HAAS, 1941).

### 1.3.13. *Yarrowia lipolytica*

A levedura ascomiceta *Yarrowia lipolytica* é uma das espécies de leveduras "não convencionais" mais intensivamente estudadas. A espécie foi originalmente classificada como *Candida*, desde que nenhum estado sexual tinha sido descrito. A forma perfeita de *C. lipolytica* foi identificada no final dos anos 60 por Wickerham, no Northern Regional Research Laboratory da USDA, em Peoria. A forma perfeita foi reclassificada primeiro como *Endomycopsis lipolytica* (WICKERHAM, 1970), depois como *Saccharomycopsis lipolytica*, e, finalmente como *Yarrowia lipolytica*. Esta levedura é bastante diferente das leveduras convencionais *Sacharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, bem-estudadas com respeito a sua evolução filogenética, fisiologia, genética e biologia molecular (BARTH; GALLAIRDAN, 1996).

*Y.lipolytica* é um fungo dimórfico natural, que forma células de leveduras, pseudohifas e hifas septadas (VAN DER WALT et al., 1984). O micélio verdadeiro consiste de hifas septadas de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largura e com vários milímetros de comprimento. As células apicais frequentemente excedem 100  $\mu\text{m}$ , enquanto que os segmentos medem de 50 a 70  $\mu\text{m}$  de comprimento. Existe um simples núcleo por segmento. O septo mostra um diminuto poro central tipo-ascomiceto, não usual para outras leveduras filamentosas, com retículo endoplasmático se estendendo através dele de um segmento para o seguinte (KREGGER-VAN RIJ et al., 1984). A proporção de diferentes formas de células depende da variedade usada, provavelmente considerando às diferenças morfológicas observadas em nível de colônia. Certas condições são conhecidas por causar uma formação preferencial de células de leveduras, ou por induzir o desenvolvimento de micélio. Essa levedura não é considerada como patogênica (HOLZSCHU, 1979).

Muitas ferramentas genéticas estão disponíveis, que fazem desta levedura um excelente organismo modelo para endereçamento de várias questões fundamentais. Métodos poderosos têm sido desenvolvidos e variedades e plasmídeos bem caracterizados estão disponíveis para transformação, expressão e secreção de genes

estranhos. Uma descrição detalhada destes métodos, assim como um resumo das variedades disponíveis, plasmídeos, genes clonados etc. é dada na revisão realizada por Barth e Gaillardin (1996).

Investigações de mecanismos de expressão gênica e de secreção de proteína para expressão de genes heterólogos são realizadas, principalmente, para aplicações biotecnológicas. Estudos fundamentais têm sido desenvolvidos sobre a estrutura e o funcionamento do genoma desta levedura, que é, em alguns aspectos, muito diferente do que é visto em outras leveduras: estrutura e manutenção de genes de rRNA polimórficos e dispersos, requisito absoluto para uma função centromérica para a manutenção de plasmídeos extracromossômicos, e estrutura genética de populações naturais que consistem de linhas haploides amplamente divergentes. Outros aspectos de *Y.lipolytica* têm sido explorados, como: determinantes do tipo de acasalamento, controle de transição dimórfica de levedura para hifa, metabolismos de alcano e de ácidos graxos, estrutura e função de *retrotransposons*, rotas glicolíticas, biogênese peroxissômica, etc (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Como fonte de carbono, *Y.lipolytica* pode utilizar *n*-alcanos e *l*-alcenos. O primeiro passo na assimilação é provavelmente uma emulsificação na superfície da célula para formar pequenas gotículas que podem ser internalizadas. Depois de entrar na célula, os *n*-alcanos são hidroxilados pelo sistema do citocromo P-450 monoxigenase. O citocromo P-450 foi detectado em diversas variedades de *Y.lipolytica* (ILCHENKO et al., 1980; MAUERSBERGER et al., 1980).

A *Yarrowia lipolytica* apresenta a capacidade de crescer em águas residuais de moinhos de oliva, bem como de degradar compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Biodegradação que é muitas vezes acompanhada pela produção de biossurfactantes. Um dos produtos mais importantes segregados por este microorganismo é a lipase que pode ser explorada para várias aplicações nas indústrias de detergente, alimentos, farmacêutica e ambiental. Além disso, *Y. lipolytica* é capaz de produzir ácido cítrico e aroma de uma variedade de fontes de carbono, incluindo açúcares, alcanos, óleos vegetais, hidrolisados de amido, etanol e glicerol.

### 1.3.14. Otimização de Processos de Biodegradação de Hidrocarbonetos

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e derivados envolve processos altamente não lineares e variantes no tempo. Devido ao grande número de variáveis físicas, químicas e biológicas envolvidas nos processos de biodegradação de hidrocarbonetos, métodos de busca multivariada são usados cada vez mais para a otimização de condições ambientais (nutricionais e operacionais). Otimização univariada, em geral, apresenta confiabilidade limitada, além de consumir muito tempo e recursos. Para reduzir o número de experimentos, a despeito do grande número de variáveis, métodos de planejamento experimental estão sendo usados em muitas pesquisas. Em geral, o procedimento de planejamento experimental para otimização de bioprocessos pode ser sintetizado em quatro etapas: (i) identificação das variáveis independentes ou fatores que mais influenciam a(s) variáveis dependentes ou respostas; (ii) identificação dos intervalos ótimos das variáveis; (iii) identificação da condição ótima e (iv) validação experimental do ótimo especificado. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) (MYERS; MONTGOMERY, 1995) tem contribuído para superar estas desvantagens e ampliar o entendimento e a eficiência econômica e tecnológica destes processos.

A MSR é usada tipicamente para investigar as relações entre diversas variáveis exploratórias e uma ou mais variáveis respostas (HUANG et al, 2008). A ideia principal da MSR é usar um conjunto de experimentos planejados para obter uma resposta ótima. Em biotecnologia, esta técnica estatística tem sido aplicada com sucesso em otimização de: (i) constituintes de meios (WANG, 1990), (ii) condições de fermentação e (iii) condições catalisadas por enzimas em experimentos de laboratório, entre outras aplicações.

A identificação e a otimização de condições de cultivo que afetem a produção de biossurfactante representa um ponto chave para o desenvolvimento de um processo custo-competitivo (MUKHERJEE et al.,2006). Otimização baseada em MSR tem sido largamente usada em otimização de componentes de meios para produção de bioemulsificantes (ALBUQUERQUE et al., 2006) e de biossurfactantes (RODRIGUES et al., 2006; MUTALIK et al, 2008; KIM, 2000) e para otimização de condições

operacionais (pH, temperatura, salinidade, concentração de glicose) em processos de produção de biossurfactantes (NAJAFI et al, 2010).

A MSR também tem sido usada em pesquisas para otimização de biodegradação de naftaleno (PATHAK et al., 2009), otimização de biodegradação de óleo cru intemperizado em sedimentos costeiros (MOHAJERI et al., 2010a), otimização de nutrientes e inóculos para biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, otimização de nutrientes para biodegradação de óleo diesel (HUANG et al., 2008) e otimização de biodegradação de fenantreno.

Vários estudos têm sido realizados sobre os impactos da suplementação de nitrogênio e fósforo sobre a biorremediação de petróleo bruto em ambientes marinhos (NIKOLOPOULOU; KALOGERAKIS, 2008; ADESODUN; MBAGWU, 2008; 2006; RUIZ et al., 2006; KNEZEVICH et al., 2006,). Entretanto, são escassos os trabalhos publicados sobre a duração do tratamento e as concentrações de nutrientes ótimas para biorremediação, usando culturas puras ou consórcios microbianos para biorremediação em água do mar (ZAHED, 2010).

Pesquisas realizadas em laboratório e em campo - visando melhorar a eficiência de processos de biodegradação de óleo diesel em água do mar, através da identificação de concentrações ótimas de nitrogênio e fósforo e pH (XIA et al, 2006; HUANG, 2008; LI et al., 2008; SOUZA et al, 2009; XIA et al., 2012) e de outras condições ambientais como aeração e agitação - têm ratificado o papel da MSR como ferramenta útil, eficaz e econômica para modelagem e otimização de biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

#### 1.4. Revisão Bibliográfica

ADESODUN, J.K., MBAGWU, J. S. C. **Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings.** Bioresour.Technol., 2008.

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

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.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2006.

ALBUQUERQUE, C.D.C, FILETI, A.M.F., CAMPOS-TAKAKI, G. M..**Optmizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method.** Canadian Journal of Microbiolology v. 6, 2006.

ALEXANDER, M. **Introduccion a la microbiologia del suelo.** 2o. Ed. Planta Alta, Mexico: libros y editoriales, 1980.

ANENG. Disponível em: <http://www.aneng.com.br/oleo-diesel/> Acesso em: 29 de setembro de 2012.

ATLAS, R.M. AND BARTH, R. **StimulatedBiodegradation of Oil Slicks Using Oleophilic Fertilizers.** *EnvironmentalScience & Technology*, 7, 1973.

ATLAS, R. M. **Bioremediation of petroleum pollutants.**International Biodeterioration and Biodegradation., 1995a.

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

ATLAS, R. M.; BARTH, R. **Microbial Ecology. Fundamentals and Applications.** 1. ed. New York: Editora Abrasoffa, 1981.

ATLAS, R. M. **Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation.** Mar. Pollut. Bull. 1995

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

BANAT, I. M. **Biosurfactants production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review.** Bioresource Technology, v.51, 1995.

BARROSO, H. S. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica.** Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. ***Yarrowia lipolytica*.** In: K. Wolf (ed.) **Nonconventional yeasts in biotechnology.** *A Handbook.* Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1996.

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

BERTRAND, J. C. **Hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration.** J. Exp. Mar. Biol. Ecol., v.168, 1993.

BÜCKER, F., 2009. **Biodegradação de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009, p. 155.

BUSHNELL, I. D.; HASS, H. E. **Utilization of certain hydrocarbon by microorganisms.** *J. Bacteriol.*, v. 41, 1941.

CAMARGO, F. A. O., **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** *Ciência e Natura*, UFSM, v. 29, 2007.

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, 1979.

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

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

CERNIGLIA, C. E. **Biodegradation Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Biodeg.* v. 3, 1992.

CERNIGLIA, C. E.; HEITKAMP, M. A. **Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment.** In *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, edited by U Varanasi. CRC press, Florida, 1989.

CERQUEIRA, V. S., HOLLENBACH, E. B., MABONI, F., VAINSTEIN, M. H., CAMARGO, F. A. O., PERALBA, M. D. C. R., BENTO, F. M. **Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures.** *Bioresour. Technol*, v. 102, 2011.

CLARK, R. B. **Oil spills and clean-up.** In *Marine Pollution*, Clarendon Press: Oxford, 1986, p. 31-46.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. **Natural bioremediation perspective for BTEX contaminated groundwater in Brazil.** *Wat. Sci. Tech.* v. 35, 1996.

CORSEUIL, H. X., KAIPPER, B. I. A., FERNANDES, M. **Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol.** *Water Research*, v. 38, 2004.

CULLEN, W. R.; LI, X. F.; REIMER, K. J. **Degradation of phenanthrene and pyrene by microorganisms isolated from marine sediment and seawater.** *The Science of the Total Environment* v.156, 1994.

FARAG, S.; SOLIMAN, N. A. **Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida tropicalis* Strain.** *Brazilian Archives of Biology and Technology* v.54, 2011.

FERREIRA, T. F., COELHO, M. A. Z.; ROCHA LEÃO, M. H. M. **Factors Influencing Crude Oil Biodegradation by *Yarrowia lipolytica*.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55, 2012.

FLOODGATE, G. D. **The fate of petroleum in marine ecosystems.** In: *Petroleum Microbiology*, edited by R.M. Atlas. Macmillan, New York, 1984.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., NELE, M., COELHO, M. A. Z., **Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica***. Journal of Biomedicine and . Biotechnology, 2010.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. **Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation**. Biodegradation, v.12, 2001.

GRADY, C. P. L. **Biodegradation: its measurement and microbiological basis**. *Biotech.Bioeng.*,v. 27, 1985.

GUTNICK, D. C.; ROSENBERG, E. **Oil tankers and pollution: a microbiological approach**. *Annual Rev. Microb.*, v.31, 1977.

HARVEY, R. G. **Polycilic Aromatic Hydrocarbons**. Wiley-VHC, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. 1997.

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

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

HENRIQUES, M. L. O. F. M.; MARQUES-SILVA, A.; CAMPOS-TAKAKI,G.M.; ALBUQUERQUE, C. D. C. **Produção de Biosurfactante/ Bioemulsificante por *Candida lipolytica* em Água do Mar Ácida e Alcalina usando Óleo de Milho como Fontede Carbono**. In *XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Caxias do Sul, 2011a.

HENRIQUES, M. L. O. M.; SILVA, A. M., JARA, A. M. A. T., ANTUNES, A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M., ALBUQUERQUE, C. D. C. **Bioemulsifier/biosurfactant**

**production by *Candida lipolytica* UCP 0988 in acid or alkaline seawater with low oxygenation.** In: IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, Málaga, Spain. n. 562, p.14-16, 2011.

HOLZSCHU, D. L., CHANDLER, F. W., AJELLO, L.; AHEARN, D. G. **Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity.** *Sabouraudia*, v. 17, 1979.

HOROWITZ, A., GUTNICK, D. ROSENBERG, E., **Sequential Growth of bacterial on Crude Oil.** Applied Microbiology, v.30, 1975, p.10-19.

HUANG, L.; MA, T.; LI, D.; LIANG, F.L.; LIU, R.L., LI, G.L. **Optimization of nutrient component for diesel degradation by *Rhodoicoccus erythropolis*.** Marine Pollution, v.56, 2008.

ILCHENKO, A. P.; MAUERSBERGER, S.; MATYASHOVA, R. N.; LOZINOV, A. B. **Induction of citocrome p-450 in the course of yeast growth on diferente substrates.** Mikrobiologija, v. 49, 1980.

JACQUES, R. J. S. **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** *Ciência e Natureza*, 2007.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”.** Tese (Doutorado) – Instituto de Bociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

KNEZEVICH, V., KOREN, O., RON, E. Z., ROSENBERG, E. **Petroleum bioremediation in seawater using guano as the fertilizer.** Biorem. J., v.10, 2006

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, J. D.; LEE, T. H. **Prurification and characteriazation of biosurfactante from *Norcadia* sp. L-417.** Biotechnology Applied Biochemistry. v. 31, 2000.

KIRAN, G. S., THOMAS, T. A., SELVIN, J., SABARATHNAM, B., LIPTON, A. P. **Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture.** *Bioresource Technology* v.101, 2010.

KOSARIC, N. **Biosurfactants e suas ações para biorremediação de solos.** *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, 2001.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W.; VEENHUIS M. **Electron microscopy of septa in ascomycetous yeasts.** *Mol. Gen. Genet*, v.146, 1984.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment.** *Microbiology Review*, v. 54, 1990.

LEE, T. H.; BYUN, I. G.; KIM, Y. O.; HWANG, I. S.; PARK, T. J.; ***Water Sci. Technol.***, v. 96, 2005.

LEMOS, J. L. SOLÓRZANO et al., **Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs).** Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

LUNA, J. M. ; RUFINO, R. D. ; ALBUQUERQUE, C. D. C. ; SARUBBO, L. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M. **Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP 0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand.** *International Journal of Molecular Sciences (Online)*; v. 12, 2011.

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

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. **Biodegradation and bioremediation of hydrocarbon in extreme environments**. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 56, 2001.

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, 2006.

MENEGHETTI, L. R. R. – **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Passo Fundo: UPF, 2007.

MITRE, T. K. **Estudo da aplicação dos processos Fenton e Foto-Fenton no tratamento de águas contaminadas por diesel/biodiesel**. Tese (Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MOHAJERI, L., AZIZ, H.A., ISA, M. H., ZAHED, M. A. **A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments**. Bioresour. Technol. v. 101, 2010a.

MOHAJERI, L., AZIZ, H. A., ISA, M. H., ZAHED, M. A., Mohajeri, S. **Ex-situ bioremediation of crude oil in soil, a comparative kinetic analysis**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. v. 85, 2010b.

MOHANTY, G.; MUKHERJI, S..**Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia***. International Biodeterioration & Biodegradation, v.61, 2008, p. 240-250.

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

MUKHERJEE, S.; DAS,P.; SEN, R. **Towards commercial production of microbial surfactants**, Trends of Biotechnology, v. 24, 2006.

MUTALIK SR, VAIDYA BK, JOSHI RM, *et al* SN. **Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from Rhodococcus spp. MTCC2574**. Bioresour Technol v. 99, 2008.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments**. *New York: John Wiley & Sons, Inc.,1995*.

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

NAGPAL, U. M. K. , BANKAR, A. V. , PAWAR, N. J. **Equilibrium and Kinetic Studies on Biosorption of Heavy Metals by Leaf Powder of Paper Mulberry (*Broussonetiapapyrifera*)**.Water, Air, & Soil Pollution, v.215, p.177-188, 2011.

NAJAFI AR, R. R., JAHANMIRI, A. H, ROOSTAAZAD, R., ARABIAN D, and GHOBADI Z. **Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of Bacillus mycoides by optimizing the growth conditions using a response surface methodology**. Chem Eng J, v. 163, 2010.

NIKOLOPOULOU, M, KALOGERAKIS, N. **Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses**.Mar.Pollut. Bull, v. 56, 2008.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. **Rhamnolipid Surfactants: na update on the general aspects of these remarkable biomolecules.** *Biotechnol. Prog.*, 2005.

OLIVER, B. G.; NIIMI, A. J. **Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in Lake Ontario ecosystem.** *Environmental Science and Technology*, v. 22, 1988.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. **Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances.** *Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, 2011.

PATHAK, H., KANTHARIA, D., MALPANI, A., MADAMWAR, D. **Naphthalene biodegradation using *Pseudomonas* sp. HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms.** *J. Hazard. Mater.*, v. 166, 2009.

PAYNE, J. F.; FANCEY, L. F. **Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments.** *Marine Environmental Research*, v. 28, 1989.

PEDROZO, M. F.; BARBOSA, E. M.; CORSEUL, H. X.; SCHIDER, M. R.; LINHARES, M. M.; **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo.** *Salavor: CRA*, 2002.

PENNER, G. C. **Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o Uso de Detetor de Fotoionização.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PEREIRA, R. S.; NIENCHESKI, L. F. H. **Avaliação do restabelecimento das condições hidroquímicas após um acidente portuário: uso do modelo Delft3D.** In: 2º Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental. Itajaí. *Anais...* Itajaí. UNIVALI, 2003.

PETROBRAS. ***Informativo da divisão de Engenharia da Produção, setor de desenvolvimento de produtos Refinaria Gabriel Passos, Petrobras e Shell Brasil S.A.*** Disponível em: <<http://w.petrobras.com.br>> - Acesso em: 12/10/2012.

RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of petroleum contaminated sites.** Boca Ratón, *FL.CRC Press*, 1992.

RODRIGUES L, TEIXEIRA J, OLIVEIRA R; VAN DER MEI HC. **Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria.** *Process Biochem*, v. 41, 2006.

RÖLING, W. F. M.; VERSEVEL, H. W. **Natural attenuation: What does the subsurface have in store?** *Biodegradation*, v.13, 2002.

RON, E. Z.; ROSEMBERG, E. **Natural role of biosurfactants.** *Environmental Microbiology*, v. 3, 2001.

ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D. L.; ***Appl. Environ. Microbiol.*** ,v. 37, 1979.

RUIZ, M., PASADAKIS, N., KALOGERAKIS, N., 2006. **Bioremediation and toxicity determination of natural seawater polluted with weathered crude oil by salttolerant consortia in a SBR.** *Mar. Pollut. Bull*, v. 52, 1493.

SANTOS, J.B. **Estudos biogeoquímicos em substrato lamoso de zonas de manguezal da região norte de S.Francisco do Conde – recôncavo baiano: subsídios a um programa de diagnósticos e monitoramento ambiental para**

**regiões de manguezal influenciadas por atividades petrolíferas.** Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente). Universidade Federal da Bahia, 2002, p. 142.

SARKAR, D.; FERGUSON, M. et al., **Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation.** Environmental Pollution, 2005.

SARKAR, D., FERGUSON, M., DATTA, R. AND BIRNBAUM, S. **Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soils: Comparison of Biosolids Addition, Carbon Supplementation, and Monitored Natural Attenuation.** *Environmental Pollution*, v. 136, 2005.

SILVA, F. M.; SEBASTIÃO, P.; CARNEIRO, C.; SOARES, C. G. **Sistema de Previsão da Evolução de Manchas de Hidrocarbonetos na ZEE.** Instituto Superior Técnico, 2000.

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

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

SONG H.G., BARTH, R. **Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil.** Applied Environmental Microbiology, v. 56, 1990.

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

SOUZA, E. S.; TRIGÜIS, J. A. **Degradação do petróleo em derrames no mar: intemperismo x biorremediação**. In: 3. Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2005.

SOUZA, F. A. S. D; SALGUEIRO, A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. **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, 2009.

TONIETTO, G. B. **Estudo da especiação química de arsênio e selênio em correntes aquosas e efluentes de refinaria de petróleo**. Tese (Doutorado em Química). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

TYAGI, M., FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. **Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improve the Effectiveness of Bioremediation Processes**. *Biodegradation*, v. 22, 2011.

VAN DER WALT, J. P.; VAN AARX, J. A. **The yeast genus *Yarrowia* gen.nov.** *Antonie van Leeuwenhoek*, v.46, 1980.

WANG, W.; KETURI, P. H. **Comparative Seed Germination Tests Using Ten Plant Species for Toxicity Assessment of a Metal Engraving Effluent Sample**. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 52, 1990.

WARD, D. M.; BROCK, T. D. **Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments**. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 35, 1978.

WICKERHAM, L. J. KURTZMAN, C. P.; HERMAN, A. I. **Sexual reproduction in *Candida lipolytica***. Science n.167, 1970.

WU, L., GE, G., WAN, J.. **Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29**. Journal of Environmental Science(China) v.2, 2009.

XIA, W. X.; LI, J. C.; ZHENG, X. L.; BI, X. J.; SHAO, J. L. **Enhanced Biodegradation of Diesel Oil in Seawater Supplemented with Nutrients**. Eng. Life Sci., v. 6, 2006.

XIA, W.; LI, J.; XIA, Y.; ZHOU, J. **Optimization of diesel oil biodegradation in seawater using statistical experimental methodology**. Water Science & Technology, v. 66, 2012.

YOUNG, L. Y. **Anaerobic degradation of aromatic compounds. Em: Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, 1984.

ZAHED, M. A. AZIZ, H. A.; ISA, H. M.; MOHAJERI, L.; MOHAJERI, S. **Optimal conditions for bioremediation of oily seawater**. Bioresource Technology, v.101, 2010a.

ZAHED, M. A. AZIZ, H. A.; ISA, H. M.; MOHAJERI, L. **Enhancement biodegradation of n-alkanes from crude oil contaminated seawater**.International Journal of Environmental Research, v.4, 2010b.

ZAHED, M. A., AZIZ, H. A., ISA, M. H., MOHAJERI, L. **Effect of initial oil concentration and dispersant on crude oil biodegradation in contaminated seawater**.Bull. Environ. Contam. Toxicol. v. 84, 2010c.

# Capítulo 2

**Artigo submetido ao periódico Bioresource Technology**

**Modelagem de concentração de biomassa e estudo dos efeitos do pH  
e nutrientes em processo de biodegradação de óleo diesel por  
*Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar**

Maria Luísa Oliveira Mergulhão de Freitas Henriques<sup>a</sup>, Galba M. Campos-Takaki<sup>a,b</sup>,  
Clarissa Daisy Costa Albuquerque<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais,  
Universidade Católica de Pernambuco,  
Rua Almeida Cunha, 245, Bloco G4, 8ºandar, 50.050-480, Boa Vista, Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia,  
Universidade Católica de Pernambuco,  
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, 50050-590, Boa Vista, Recife, PE, Brasil.

**\*Autor para correspondência**

Phone:+55-81-21194017

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

## RESUMO

*Candida lipolytica* UCP 0988 foi capaz de crescer em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, e usar óleo diesel como única fonte de carbono. Um planejamento fatorial  $2^4$  foi realizado para investigar os efeitos e interações de pH inicial e concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre concentração de biomassa, tensão superficial, atividade de emulsificação, salinidade e pH com 96h em processo de biodegradação de óleo diesel. As concentrações de biomassa variaram entre 7 e 36 g/L e as reduções das tensões superficiais entre 8 e 37 %. Um modelo para concentração de biomassa em função do pH e concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio foi desenvolvido usando metodologia de superfície de resposta. Um alto coeficiente de determinação ( $R^2=0,9544$ ) e um p-valor baixo ( $p<0,05$ ) garantem a significância estatística do modelo. A falta de ajuste não significativa ( $p>0,05$ ) sugere a adequação do modelo para explicar dados na região estudada.

**Palavras-chave:** Metodologia de superfície de resposta; Biodegradação; Óleo diesel; Biossurfactante; Biorremediação marinha.

## 1. Introdução

A demanda global por energia proveniente de combustíveis fósseis tem contribuído para o aumento do risco potencial de contaminações de mares e oceanos por petróleo e produtos petrolíferos. Devido ao seu uso intensivo para o transporte de passageiros e de carga por terra e mar, o óleo diesel é um dos combustíveis mais consumidos do mundo e embora em uma escala menor que o petróleo, tem causado poluição marinha por hidrocarbonetos e graves problemas ambientais, sociais e econômicos. O monitoramento, otimização e controle de recursos naturais e ciclos de vida de processos e produtos químicos, petroquímicos e biotecnológicos, visando à preservação da qualidade ambiental, é um dos grandes desafios deste milênio.

Diversos métodos físicos, químicos e biológicos estão disponíveis para aplicação individual ou integrada em remediação de ambientes oceânicos contaminados com hidrocarbonetos. A biorremediação microbiana é uma tecnologia alternativa, ambientalmente amigável e custo-efetiva, na qual processos de biodegradação têm sido usados para converter contaminantes orgânicos em energia, massa celular e substâncias não tóxicas ou menos nocivas para o meio ambiente.

Muitos micro-organismos são conhecidos por terem excelente capacidade para degradar hidrocarbonetos e/ou produzir biossurfactantes. A produção de biossurfactantes é a resposta microbiana à biodisponibilidade limitada de compostos orgânicos hidrofóbicos (Leahy e Colwell, 1990; Johnsen e Karlson, 2004; Banat et al., 2010; Abdel-Mawgoud et al., 2010, Darvish et al., 2011, Pacwa-Plociniczak et al., 2011.

De acordo com vários autores, as bactérias degradam hidrocarbonetos mais eficientemente do que as leveduras. No entanto, há também informações de leveduras que degradam os hidrocarbonetos com maior eficiência do que as bactérias (Ijah, 1998, Chrzanowski et al., 2006).

A eficácia da degradação de hidrocarbonetos no ambiente marinho é influenciada principalmente por: (i) tipo e concentração dos hidrocarbonetos; (ii) concentração inicial de micro-organismos (biomassa) com capacidade enzimática para degradação de hidrocarbonetos complexos, (iii) disponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos para os micro-organismos; (iv) disponibilidade de oxigênio dissolvido na água do mar e (v) concentração de nitrogênio e fósforo na água do mar (Atlas, Bartha, 1972; Reisfeld et al., 1972; Leahy e Colwell, 1990; Marquez-Rocha et al, 2001; Thavasi et al , 2006, Xia et al, 2006; Prince et al., 2010; Xia et al, 2012). Existem muitos outros fatores ambientais externos que afetam a biodegradação e também a produção de biossurfactantes na água do mar, por exemplo: pH, salinidade, temperatura e pressão (Reisfeld et al., 1972; Leahy e Colwell, 1990; Zinjarde e Pant, 2002).

Portanto, em ambiente marinho, devido aos baixos níveis de nitrogênio e fósforo na água do mar, geralmente é necessário identificar as concentrações adequadas destes nutrientes para melhorar a biodegradação de hidrocarbonetos. A adição de micro-organismo(s) com capacidades metabólicas apropriadas para enfrentar condições ambientais altamente estressantes, é também fundamental para se obter biodegradação mais rápida e efetiva de hidrocarbonetos em água do mar (Xia et al., 2006; Prince et al., 2010; Das, Chandran, 2011; Xia et al, 2012). Pesquisas têm

mostrado que cepas de *Yarrowia lipolytica* degradam o petróleo eficientemente na água do mar (Zinjarde, Pant, 2002; Hassanshahian et.al., 2012). Estudos realizados com culturas puras de *Candida lipolytica* UCP 0988, ratificam o potencial desta levedura, para crescer e produzir biossurfactantes/bioemulsificantes em água do mar, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, utilizando o óleo diesel como a única fonte de carbono (Souza et al, 2012).

Em geral, os consórcios microbianos realizam uma degradação mais extensiva do que as culturas puras. No entanto, o desenvolvimento de consórcio para biodegradação efetiva de hidrocarbonetos está diretamente relacionado às especificidades e eficiências de biodegradação das culturas puras envolvidas (Reisfeld et al., 1972; Horowitz et al., 1975; Mohanty, Mukherjy, 2008, Kaczorek, Olszanowski, 2011).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas para a construção de modelos empíricos, em que uma resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o objetivo é otimizar essa resposta (Montgomery 2005). Planejamentos experimentais estatísticos associados a MSR têm sido aplicados com sucesso para melhorar o desempenho de processos de produção de biossurfactantes (Albuquerque et al., 2006) e de biodegradação de hidrocarbonetos em água do mar (Xia et al., 2012).

No presente trabalho, a habilidade da levedura *C. lipolytica* UCP 0988 degradar óleo diesel, em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, foi investigada através de um planejamento fatorial completo (PFC) <sup>24</sup> associado a MSR. Um modelo para estimar a concentração da biomassa em

função do pH e das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio foi desenvolvido, como primeira etapa de uma estratégia sequencial de otimização do processo de biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988 em água do mar. Os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis resposta foram analisados.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Micro-organismo e Meio de Preservação**

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

### **2.2. Óleo Diesel**

Óleo diesel Petrobras, tipo metropolitano B5 (5% biodiesel, 95% petrodiesel). Contém hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos (10-40% v/v), teor

máximo de enxofre de 0,05% p/p (500 ppm) e impurezas de compostos nitrogenados e compostos oxigenados e aditivos.

### 2.3. Água do Mar

A água do mar foi coletada de praia (9° 36' 59" S; 35° 1' 36" W) próxima ao Complexo Portuário-Industrial de Suape, Pernambuco, Brasil. Sua composição iônica foi: Ca<sup>++</sup> 0,48‰; Mg<sup>++</sup> 1,36‰; Na<sup>+</sup> 11,20‰; K<sup>+</sup> 0,55‰, Cl<sup>-</sup> 20,00‰, SO<sub>4</sub><sup>--</sup> 3,27‰. A salinidade, a gravidade específica, o pH e a tensão superficial foram respectivamente iguais a 43‰; 1035 kg/m<sup>3</sup>, 7.19 e 49.6 mN/m.

### 2.4. Determinações analíticas

Amostras foram coletadas durante 4 dias para análises de pH, salinidade, gravidade específica, concentração de biomassa, tensão superficial e atividade de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho (EAO). A concentração de biomassa foi determinada pelo método do peso seco de acordo com Zhou and Kosaric (1995). O pH foi determinado por potenciometria e a salinidade e a gravidade específica por refratometria. A tensão superficial foi medida pelo método do anel de *Du Noy*. A atividade de emulsificação do cultivo livre de células foi determinada de acordo com o método descrito por Cirigliano e Carman (1984). O método define uma unidade de emulsificação como a quantidade de emulsificante que produzirá uma emulsão com absorvância de 1,0 em 540 nm, ou seja, a quantidade de emulsificante capaz de elevar a absorvância do sistema em uma unidade.

## 2.5. Planejamento Fatorial dos Ensaios de Biodegradação de Óleo Diesel

A biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando óleo diesel como única fonte de carbono foi investigada. Um planejamento fatorial completo  $2^4$  foi realizado para verificar os efeitos e interações do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) e fosfato monobásico de potássio (fonte de fósforo) sobre os valores finais de concentração de biomassa, tensão superficial, pH e salinidade. Os níveis e intervalos de variações dos componentes (fatores ou variáveis independentes) estão apresentados na Tabela 1 e foram escolhidos de acordo com experimentos preliminares (Souza et al, 2012).

Um total de 20 experimentos foi realizado, incluindo 4 repetições no ponto central para a 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 biodegradação foram pesados e dissolvidos em água mar e o pH ajustado de acordo com as especificações da Tabela 1. Os meios foram autoclavados a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos, em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL. O inóculo foi obtido a partir de cultura pura de *C. lipolytica* UCP 0988 mantida em  $28^\circ\text{C}$  por 48 h. A inoculação foi realizada, em câmara de fluxo laminar, na proporção de 5% do volume de trabalho, usando suspensão de  $10^6$  células/mL. O óleo diesel foi autoclavado em vapor fluente e adicionado aos meios, de acordo com as especificações do planejamento. Os frascos com volume de trabalho

de 750 mL foram incubados em agitador rotativo, por 96h, com a temperatura controlada em 28°C e a agitação em 200 rpm.

**Tabela 1** .Níveis e valores dos fatores do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>

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

## 2.6. Metodologia de superfície de resposta (MSR)

MSR associada a PFC 2<sup>4</sup> foi usada para desenvolver um modelo de primeira ordem para a concentração de biomassa ( $y$ ), tendo como variáveis independentes: o pH inicial ( $x_1$ ), a concentração de óleo diesel ( $x_2$ ) e as concentrações de sulfato de amônio ( $x_3$ ) e fosfato monobásico de potássio ( $x_4$ ). A forma geral do modelo desenvolvido é dada pela seguinte equação:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^4 a_i x_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 a_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

onde:  $y$  é variável resposta,  $a_0$  é o intercepto,  $a_i$  e  $a_{ij}$  são os coeficientes da regressão do modelo e  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes.

Os dados experimentais do PFC 2<sup>4</sup> foram submetidos a análise de regressão e análise de variância (ANOVA) com limites de confiança de 95%. A qualidade do ajuste do modelo polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação R<sup>2</sup> e sua significância estatística foi testada pelo valor F de Fisher.. A significância de cada coeficiente de regressão e efeito estimado foi determinada pelo teste *t* de Student e valor *p*. Diagramas de Pareto - com nível de significância de 95 % - foram empregados para ilustrar as estimativas padronizadas dos efeitos dos fatores sobre às variáveis resposta. O comprimento de cada barra sobre um diagrama de Pareto padronizado é proporcional ao valor absoluto de seu coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. Cada efeito é convertido para a estatística *t* pela divisão dele pelo seu erro padrão. Os efeitos padronizados são apresentados em ordem decrescente de magnitude absoluta. O diagrama inclui uma linha vertical tracejada indicando significância estatística. Um efeito é considerado significativo se ele cruza esta linha ( $p=0,05$ ). Representações gráficas tridimensionais foram geradas para avaliar visualmente os efeitos e interações dos fatores sobre as variáveis resposta. A análise estatística. foi realizada usando o programa STATISTICA®, versão 8.0 (Statsoft. Inc, Tulsa/OK,USA).

### 3. Resultados

A matriz decodificada do planejamento 2<sup>4</sup> e os resultados - com 96 h - das variáveis resposta -pH, salinidade, biomassa, tensão superficial e atividade de emulsificação para EAO- estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composições dos meios de biodegradação e resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com 96 h.

Ens	pHi	OD (%v/v)	SA (g/L)	FP (g/L)	pHf	ΔpH (%)	Sal (‰)	ΔSal (%)	TS (mN/m)	ΔTS (%)	AEM (UAE)	Bio Exp. (g/L)	Bio Prev. (g/L)
1	6	10	0,10	0,68	5,66	5,67	55	1,79	48,50	30,45	3,81	11,2	11,46
2	14	10	0,1	0,68	9,82	29,86	55	8,33	44,86	8,56	5,49	8,6	10,06
3	6	30	0,1	0,68	5,61	6,50	60	7,14	54,56	15,19	5,85	7,0	7,21
4	14	30	0,1	0,68	8,84	36,86	56	0,00	34,13	37,06	5,32	14,0	12,06
5	6	10	1,1	0,68	5,75	4,17	55	35,29	46,40	25,71	6,00	13,4	14,76
6	14	10	1,1	0,68	9,14	34,71	50	9,09	44,53	15,12	5,67	14,8	11,71
7	6	30	1,1	0,68	5,91	1,50	56	1,75	45,76	30,98	5,93	10,6	8,762
8	14	30	1,1	0,68	9,42	32,71	56	3,45	44,80	0,22	5,85	8,4	11,96
9	6	10	0,1	2,04	5,74	4,33	61	10,29	46,00	12,88	5,63	9,8	9,71
10	14	10	0,1	2,04	8,02	42,71	65	0,00	38,40	6,57	5,68	16,0	14,36
11	6	30	0,1	2,04	5,72	4,67	67	0,00	52,26	16,86	3,15	15,6	15,21
12	14	30	0,1	2,04	9,20	34,29	62	17,33	48,53	15,83	5,75	24,0	26,11
13	6	10	1,1	2,04	5,80	3,33	58	17,14	49,77	6,68	3,99	15,6	14,06
14	14	10	1,1	2,04	8,84	36,86	65	4,41	46,26	2,53	6,00	13,8	17,06
15	6	30	1,1	2,04	5,90	1,67	58	17,14	45,77	33,31	5,48	15,8	17,81
16	14	30	1,1	2,04	11,16	20,29	47	42,68	44,90	13,45	5,44	30,8	27,06
17	10	20	0,6	1,36	7,75	22,50	58	9,38	45,40	26,42	5,55	33,2	33,80
18	10	20	0,6	1,36	8,90	11,00	57	5,00	42,37	26,78	5,54	32,0	33,80
19	10	20	0,6	1,36	6,95	30,50	57	3,39	39,53	35,89	5,53	34,0	33,80
20	10	20	0,6	1,36	6,94	30,60	57	5,00	39,26	32,19	5,58	36,0	33,80

pHi-pH inicial pHf- pH final OD-Óleo Diesel SA-Sulfato de Amônio FP- Fosfato Monobásico de Potássio Δ-Varição (redução)  
 Sal –Salinidade TS-Tensão Superficial Bio- Biomassa AEM -Atividade de Emulsificação para emulsões água-em- óleo de milho  
 Bio.Exp.- Biomassa Experimental Bio. Prev. –Biomassa Prevista

### 3.1 Identificação dos melhores meios para a biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar

Os meios que apresentaram as melhores condições para biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988 são apresentados na Tabela 3 e na Figura 1.

A maior produção de biomassa (33,80±1,68 g/L) foi obtida com 96 horas nas condições do ponto central do planejamento (Fig. 1a), em um meio contendo água do mar suplementada com 0,68g/L de sulfato de amônio e 1,36 g/L de fosfato monobásico de potássio, pH inicial 10 e tendo o óleo diesel como única fonte de carbono (20% do volume de trabalho). Neste meio, a atividade de emulsificação média para EAO foi igual a 5,55 UAE e as reduções médias de tensão superficial, pH e salinidade foram

iguais a 30,32; 23,65 e 5,69% respectivamente. A redução média da tensão superficial no ponto central do planejamento, com pH inicial 10, foi superior as reduções médias de tensões superficiais dos meios com pH inicial 6 (21,51%) e 14 (12,41%).

Entretanto, a maior redução de tensão superficial do planejamento (37,06%) ocorreu no ensaio 4 (Fig. 1b), em um meio com pH inicial 14, concentração final de biomassa igual a 14 g/L, atividade de emulsificação para EAO igual a 5,32 UAE e reduções de pH e salinidade com 96 horas, respectivamente iguais a 36,86 e 0%. A produção média de biomassa nos ensaios realizados com pH inicial 14 foi igual a  $16,3 \pm 7,6$  g/L. As outras três maiores produções de biomassa (30,8; 24,0 e 16,0 g/L), neste pH, ocorreram nos ensaios 16, 12 e 10, com concentrações de óleo diesel iguais a 30, 30 e 10%. respectivamente,

Os ensaios realizados com pH inicial 6, também apresentaram uma boa produção de biomassa, com média igual a  $12,4 \pm 3,2$  g/L.

Por outro lado, o ensaio 5 com pH inicial 6 e biomassa final igual a 13,4 g/L (Fig. 1c) e o ensaio 14 com pH inicial 14 e biomassa final igual a 13,8 g/L (Fig. 1d) foram os que apresentaram as maiores atividades de emulsificação para EAO (6 UAE). As reduções da tensão superficial, do pH e da salinidade com 96 h referentes ao ensaio 5 foram respectivamente iguais a 25,71; 4,17 e 35,29%, enquanto as referentes ao ensaio 14 foram iguais a 2,53; 36,86 e 4,41%, respectivamente.

**Tabela 3.** Identificação dos melhores meios para biodegradação de óleo diesel em água do mar

Ensaio	pH	OD (%v/v)	SA (g/L)	FP (g/L)	pH	$\Delta$ pH (%)	Sal (‰)	$\Delta$ Sal (%)	TS (mN/m)	$\Delta$ TS (%)	Bio	AEM (UAE)
4	14	30	0,1	0,68	8,84	36,86	56	0,00	34,13	37,06	14,0	5,32
5	6	10	1,1	0,68	5,75	4,17	55	35,29	46,40	25,71	13,4	6,00
14	14	10	1,1	2,04	8,84	36,86	65	4,41	46,26	2,53	13,8	6,00
17	10	20	0,6	1,36	7,75	23,65	58	5,69	45,40	26,42	33,2	5,55

OD-Óleo Diesel SA-Sulfato de Amônio FP- Fosfato Monobásico de Potássio Sal -Salinidade TS-Tensão Superficial Bio-Biomassa AE-Atividade de Emulsificação para emulsões água-em- óleo de milho  $\Delta$ -Variação

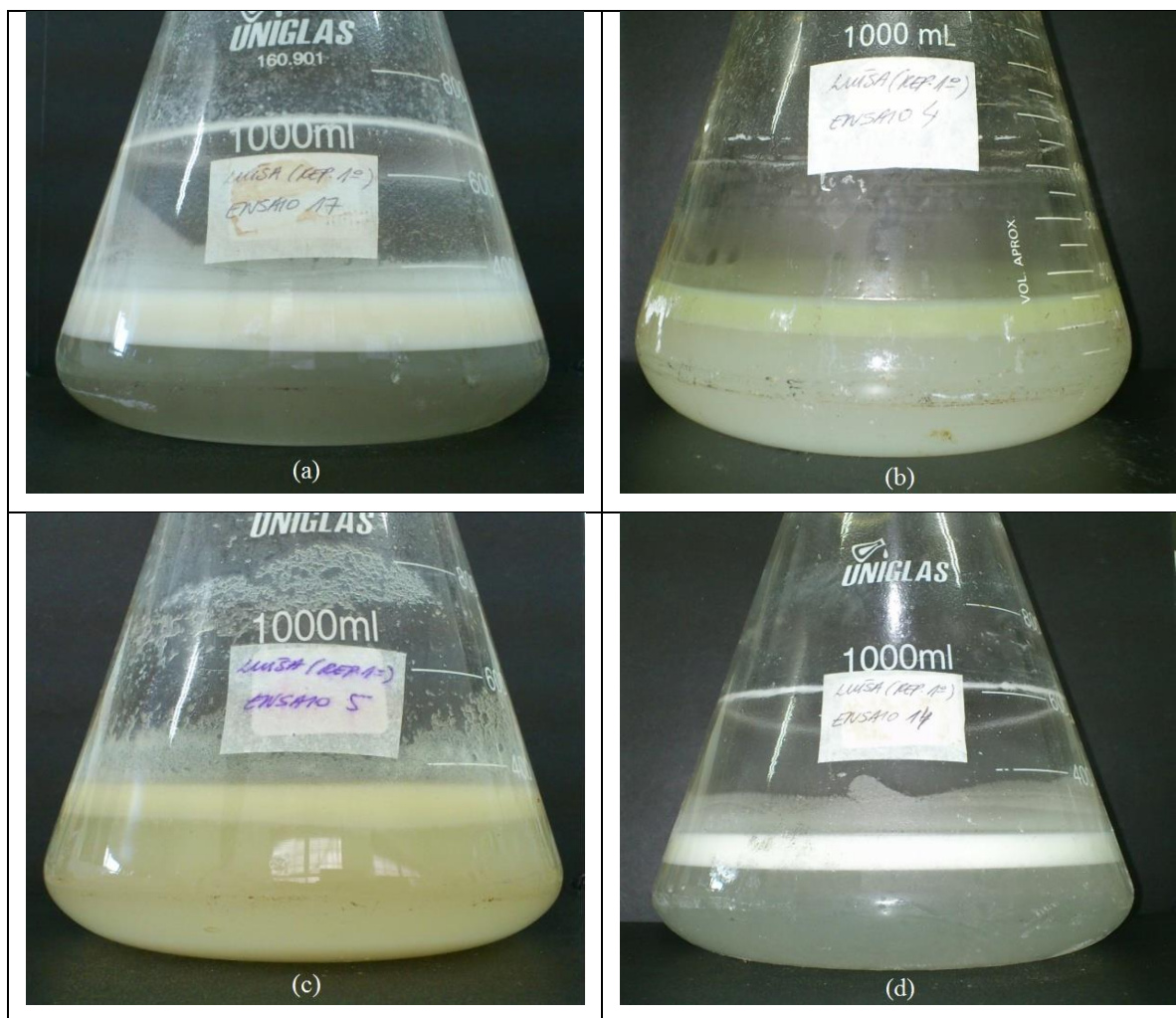


Fig. 1. Melhores ensaios do planejamento fatorial completo  $2^4$ : (a) Ponto central, maior produção de biomassa, (b) Ensaio 4, maior redução de tensão superficial, (c) Ensaio 5, maior atividade de emulsificação em pH 6 e (d) Ensaio 14, maior atividade de emulsificação em pH 14.

### 3.2. Modelagem da concentração de biomassa usando MSR

Um modelode primeira ordem incluindo interações de segunda ordem e teste de curvatura foi desenvolvido pela aplicação de MSR aos dados e resultados do PFC 2<sup>4</sup>(Tabela 2). A análise de regressão produziu a seguinte equação

$$y = \mathbf{22.07375} - 0.92312 * x_1 - \mathbf{0.68187} * x_2 + 4.88750 * x_3 - \mathbf{8.28493} * x_4 + \\ + \mathbf{0.03906} * x_1 * x_2 - 0.20625 * x_1 * x_3 + \mathbf{0.55607} * x_1 * x_4 - 0.08750 * x_2 * x_3 + \\ + \mathbf{0.35846} * x_2 * x_4 + 0.77206 * x_3 * x_4 (2)$$

onde  $y$  é a concentração de biomassa;  $x_1$  é o pH,  $x_2$  é a concentração de óleo diesel,  $x_3$  é a concentração de sulfato de amônio e  $x_4$  é a concentração de fosfato monobásico de potássio. Apenas os valores dos coeficientes de regressão mostrados em negrito são estatisticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

A análise de variância (Tabela 4) mostra que o modelo proposto é estatisticamente significativo ( $p < 0,5$ ) e preditivo, como é evidente do teste F de Fisher, onde o valor F calculado é aproximadamente cinco vezes maior que o valor F tabelado.

**Tabela 4** - Análise de variância para resultados do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Fcal.	p
Curvatura	1212,125	1	1212,125	428,82	0,000246
Regressão	1680,710	11	152,792	15,23	0,0003471
Resíduo	80,272	8	10,034		
Falta de ajuste	71,793	5,000	14,359	5,08	0,1057077
Puro erro	8,480	3,000	2,827		
Total	1760,982	19	92,683		
R <sup>2</sup> =0.9544	R= 0,9769	R <sup>2</sup> ajust=0.8917	F(0.95,11,8)=3.31	F(0.95,5,3)=9.01	

O alto valor do coeficiente de determinação  $R^2$  indica que 95,44% da variabilidade nos dados é explicada pelo modelo. O coeficiente de correlação  $R$  igual a 0,9769 indica uma excelente correlação entre os valores experimentais e preditos. O valor do coeficiente de correlação ajustado ( $R^2_{\text{ajust}}=0,8917$ ) também é alto, ratificando a significância do modelo. Isto assegura um ajuste satisfatório do modelo aos dados experimentais. O valor  $F$  da falta de ajuste de 0,1057 implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro ( $p>0,05$ ). Portanto, o modelo proposto é adequado para descrever os dados observados. As respostas estimadas para 20 pontos experimentais estão apresentadas na Tabela 2. Teste de curvatura confirmou a proximidade do ponto ótimo e a necessidade de implementação – dentro de uma estratégia sequencial de otimização - de um planejamento central composto e de um modelo quadrático que incorpore melhor o efeito da curvatura.

Superfícies de resposta tridimensionais para a concentração de biomassa construídas usando a Eq.(2) são apresentadas na Fig.2, correspondendo aos efeitos combinados de: pH e concentração de óleo diesel (Fig.2a); pH e concentração de sulfato de amônio (Fig.2b); pH e concentração de fosfato monobásico de potássio (Fig. 2c); concentração de sulfato de amônio e concentração de fosfato monobásico de potássio (Fig.2d); concentração de óleo diesel e concentração de sulfato de amônio (Fig.2e) e concentração de óleo diesel e concentração de fosfato monobásico de potássio (Fig.2f). As referidas superfícies permitem visualizar as condições que levam a maior produção de biomassa. Pode ser observado facilmente que o aumento do pH e das concentrações de óleo diesel e de fosfato monobásico de potássio favorecem o aumento da concentração de biomassa.

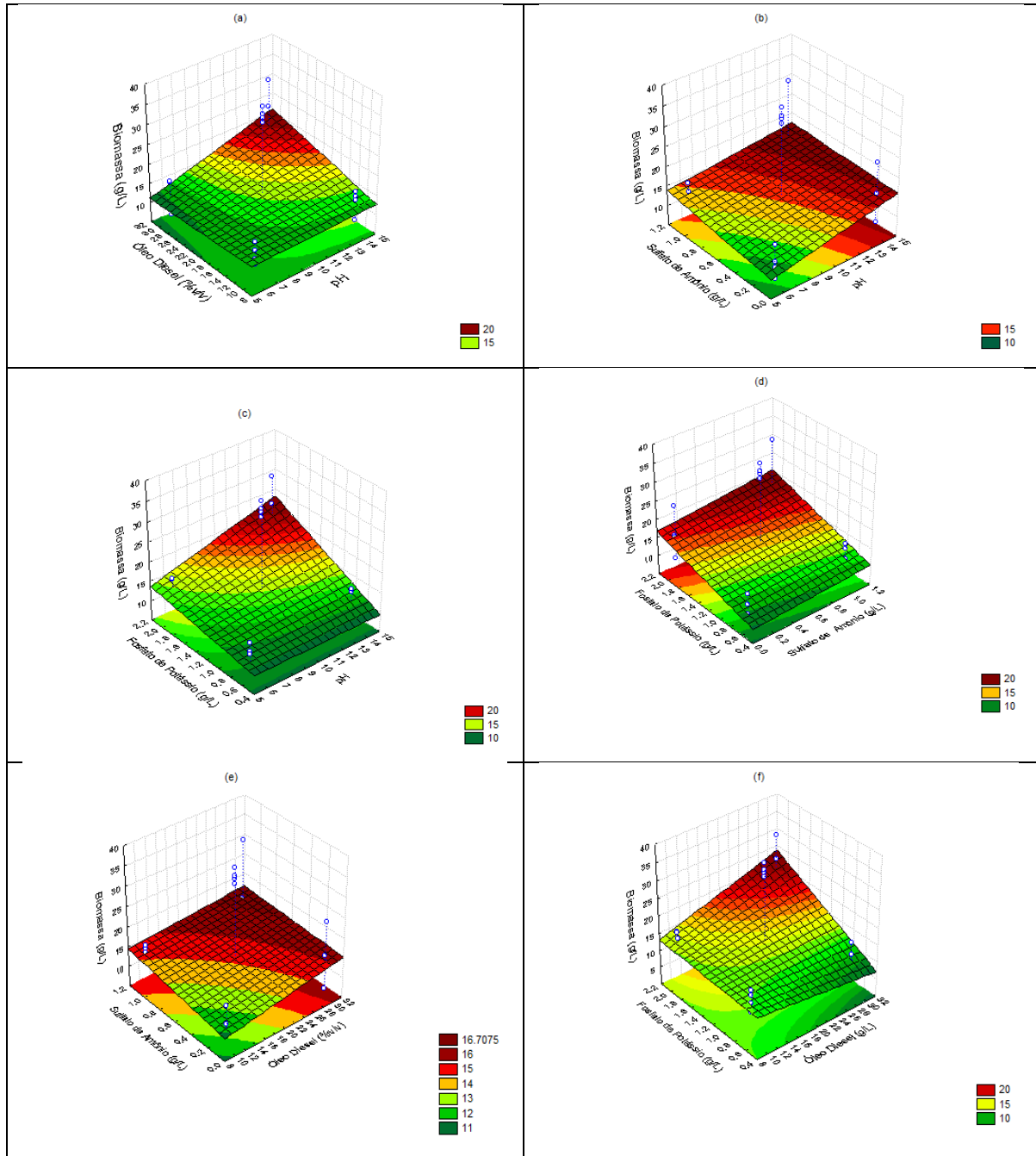


Fig. 2. Superfícies de resposta para concentração de biomassa com 96 h em função de: (a) pH e óleo diesel (b) pH e sulfato de amônio, (c) pH e fosfato monobásico de potássio, (d) sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, (e) óleo diesel e sulfato de amônio e (f) óleo diesel e fosfato monobásico de potássio.

### **3.3. Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a concentração de biomassa**

Em todos os ensaios realizados houve uma grande produção de biomassa. A forte influência do pH na biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C. lipolytica* UCP 0988 pode ser facilmente observada nos resultados apresentados na Tabela 2. A concentração de biomassa com 96 h variou entre 7,0 e 15,8 g/L nos ensaios com pH inicial 6 e entre 8,4 e 30,8 g/L nos ensaios com pH inicial 14 (Tabela 2). De acordo com o Diagrama de Pareto (Fig. 3a), para um nível de confiança de 95%, é possível verificar que o aumento da concentração de fosfato monobásico de potássio, sua interação com o óleo diesel e o aumento do pH de 6 para 14 foram os fatores que mais influenciaram a concentração de biomassa, exercendo efeitos positivos estatisticamente significativos sobre seu aumento e conseqüentemente sobre a biodegradação de óleo diesel. As interações do pH com o fosfato monobásico de potássio e com o óleo diesel e o aumento da concentração de óleo diesel também favoreceram com significância estatística a concentração de biomassa. O aumento da concentração de sulfato de amônio e suas interações com os demais fatores não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a concentração de biomassa.

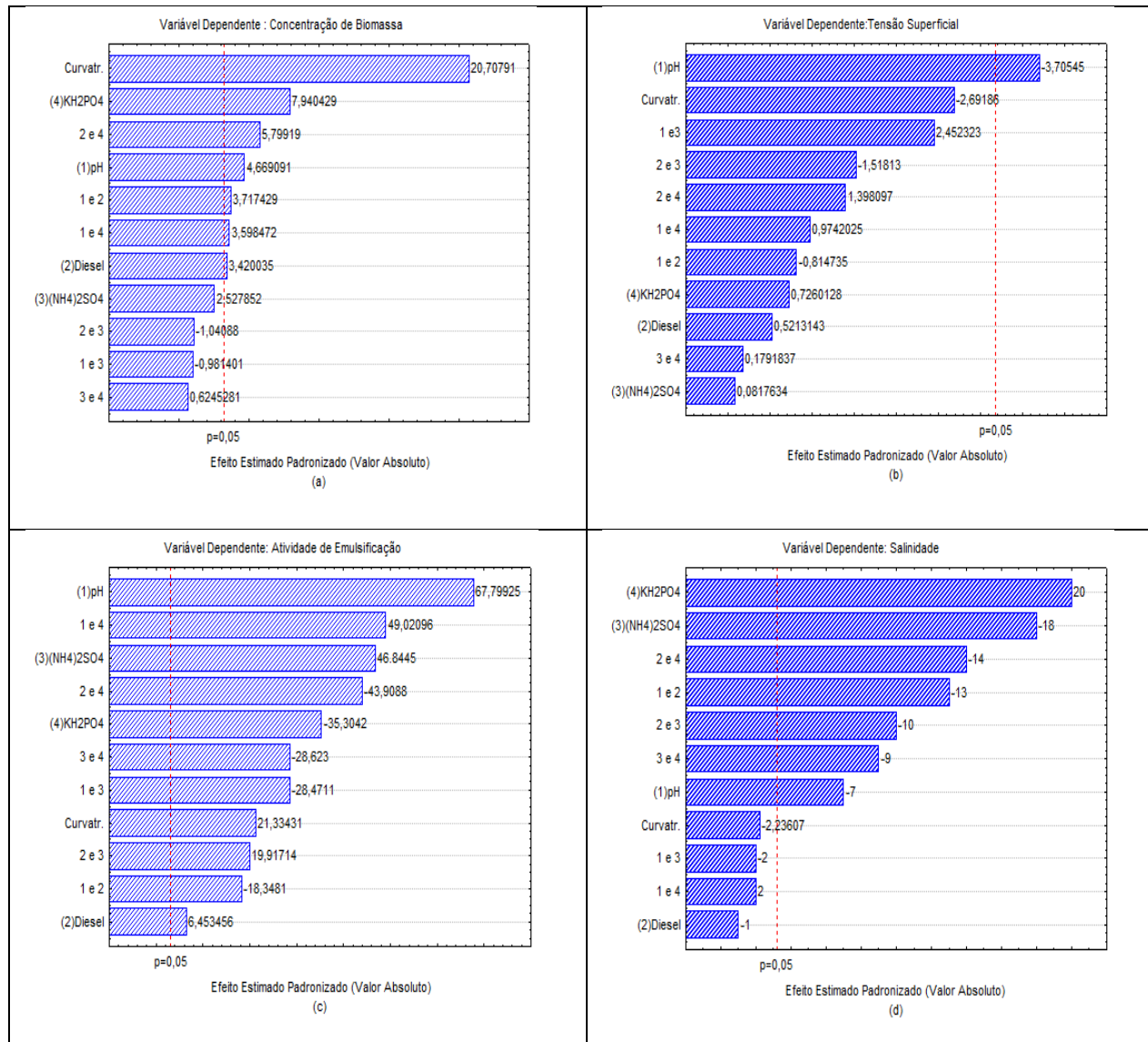
### **3.4. Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a tensão superficial**

A tensão superficial com 96 h variou entre 45,76 e 54,56 mN/m nos ensaios com pH inicial 6 e entre 34,13 e 48,53 mN/m nos ensaios com pH inicial 14 (Tabela 2). As

tensões superficiais médias dos meios com pH inicial 6, 10 e 14 foram respectivamente iguais a  $48,63 \pm 3,34$ ;  $41,64 \pm 2,84$  e  $42,55 \pm 4,86$  mN/m. Para as mesmas concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, os meios com pH 14 apresentaram menor tensão superficial que os meios com pH 6. O aumento do pH inicial de 6 para 14 favoreceu a redução da tensão superficial dos meios, exercendo um efeito negativo estatisticamente significativo sobre o aumento da tensão superficial (Fig. 3b). Os demais fatores e interações não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a redução da tensão superficial.

### **3.5. Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação para EAO**

A atividade de emulsificação para EAO com 96 h variou entre 3,15 e 5,93 UAE nos ensaios com pH inicial 6 e entre 5,32 e 6,00 UAE nos ensaios com pH inicial 14 (Tabela 2). As tensões superficiais médias dos meios com pH inicial 6, 10 e 14 foram respectivamente iguais a  $4,98 \pm 1,14$ ;  $5,55 \pm 0,02$  e  $5,65 \pm 0,22$  UAE. O aumento da atividade de emulsificação para EAO foi favorecido com significância estatística pelo aumento do pH e por sua interação com o fosfato monobásico de potássio; pelo aumento da concentração de sulfato de amônio e por sua interação com o óleo diesel e pelo aumento da concentração de óleo diesel (Fig. 3c). Por outro lado, a interação do óleo diesel com o fosfato monobásico de potássio, o aumento da concentração de fosfato monobásico de potássio e as interações do pH com o sulfato de amônio e com o óleo diesel exerceram efeitos negativos estatisticamente significativos sobre o aumento da atividade de emulsificação para EAO.



**Fig. 3.** Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para planejamento fatorial completo  $2^4$  tendo como variáveis independentes: (1) pH (2) óleo diesel, (3) ammonium sulfato de amônio e (4) fosfato monobásico de potássio e como variáveis respostas com 96 h: (a) concentração de biomassa, (b) tensão superficial, (c) atividade de emulsificação para emulsão água-em-óleo de milho e (d) salinidade. O ponto em que o efeito estimado é estatisticamente significativo ( $p = 0.050$ ) é indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

### 3.6. Efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a salinidade

A salinidade com 96 h variou entre 55 e 67‰ nos ensaios com pH inicial 6 e entre 47 e 65‰ nos ensaios com pH inicial 14 (Tabela 2). Os valores médios das salinidades dos ensaios com pH inicial 6, 10 e 14 foram respectivamente iguais a  $58,75 \pm 3,99$ ;  $57,4 \pm 0,50$  e  $57 \pm 6,63$  ‰. O único fator que contribuiu para o aumento da salinidade final dos meios foi o aumento da concentração de fosfato monobásico de potássio (Fig. 3d). Por outro lado, o aumento da concentração de sulfato de amônio e as interações do óleo diesel com o fosfato monobásico de potássio, do pH com o óleo diesel, do óleo diesel com sulfato de amônio, do sulfato de amônio com o fosfato monobásico de potássio e o aumento do pH, nesta ordem, contribuíram com significância estatística para reduzir a salinidade dos meios. O aumento da concentração de óleo diesel e as interações do pH com o sulfato de amônio e com o fosfato monobásico de potássio não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a salinidade.

## 4. Discussão

A primeira etapa de uma estratégia sequencial de otimização para biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C. lipolytica* UCP 0988 foi realizada usando um PFC 2<sup>4</sup> associado a metodologia de superfície de resposta para investigar os efeitos do pH inicial e das concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato

monobásico de potássio (Tabela 1) sobre o pH, a salinidade, a tensão superficial, a atividade de emulsificação e a produção de biomassa com 96h.

Entre as diversas condições ambientais (pH e concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato de potássio) investigadas, aquelas identificadas como sendo as melhores para a biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C.lipolytica* UCP 0988 são apresentadas na Tabela 3: As condições dos ensaios 4, 5, 14 e 17 (ponto central) produziram respectivamente: (i) a maior redução de tensão superficial e a maior redução de pH; (ii) a maior atividade de emulsificação para EAO; (iii) a maior redução de pH e maior atividade de emulsificação para EAO e (v) a maior produção de biomassa.

Estes resultados mostram que a levedura *C. lipolytica* UCP 0988 apresenta comportamento halo-álcali-tolerante sendo capaz de biodegradar óleo diesel e crescer em água do mar hipersalina, ácida ou extremamente alcalina, adequadamente suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

Os altos valores de atividade de emulsificação para EAO, redução de pH, redução de tensão superficial e produção de biomassa obtidos em ensaios do PFC 2<sup>4</sup>, especialmente nos ensaios 4, 5, 14 e 17, podem ser consideradas como indicadores biológicos de biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C. lipolytica* UCP 0988. Estes resultados estão de acordo com trabalhos da literatura, que relatam que a habilidade de leveduras crescerem em meio mineral tendo hidrocarbonetos como única fonte de carbono é um forte indicativo de utilização de hidrocarbonetos pelas mesmas (Gomes et al., 2009, Kumari e Abraham, 2011; Sood e Lal, 2009).

O micro-organismo usado nos ensaios do planejamento (cadastrado na coleção de cultura do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como *Candida lipolytica* UCP 0988) foi originalmente classificado como *Candida lipolytica* e depois reclassificado como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (Barth e Galardin, 1996). É um micro-organismo do tipo leveduriforme, estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, classe Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos. Pertence ao grupo das leveduras não convencionais, em relação à fisiologia, genética e a biologia molecular sendo, portanto, a espécie mais estudada desse grupo.

Nos experimentos realizados neste trabalho, *C.lipolytica* UCP 0988 mostrou ser capaz de crescer em água do mar hipersalina (salinidade >4,7%), ácida (pH 6), alcalina (pH 10) ou extremamente alcalina (pH 14), contaminadas com óleo diesel e suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio e produzir biossurfactantes e bioemulsificantes. Apesar de crescer em pH ácido, a levedura apresentou maior habilidade para crescer (maior produção de biomassa) e produzir biossurfactantes/ bioemulsificantes (maior redução de tensão/atividade de emulsificação) em meios alcalinos e extremamente alcalinos.

Estes resultados ratificam pesquisas anteriores sobre a habilidade da levedura *C. lipolytica* UCP 0988 crescer sobre compostos hidrofóbicos em água do mar diluída (Vance-Harrop et al, 2003; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al, 2006) ou em água do mar não diluída (Souza et al., 2012; Silva, 2012; Silva, et al., 2010; Henriques et al., 2011), adequadamente suplementadas com fonte de nitrogênio e fósforo e produzir bioemulsificantes e/ou biossurfactantes com potencial de uso em biodegradação de

ambientes contaminados por petróleo e derivados. Por outro lado, o comportamento halo-alcalitolerante exibido pela levedura ao crescer sobre óleo diesel, em água do mar extremamente alcalina (pH 14) - confirma resultados similares verificados em processos de biodegradação de óleo de milho (Henriques et al, 2011) e de querosene (Silva et al., 2012) sobre a tolerância da referida levedura a ambientes altamente salinos e alcalinos.

Desde que a salinidade típica da água do mar está entre 3 e 3,5% e seu pH normalmente varia entre 7,5 e 8,5 (devido ao excelente sistema tampão dos oceanos, resultante da interação entre o dióxido de carbono e a água do mar) ,Henriques et al., 2011, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que *C.lipolytica* UCP 0988 tem um grande potencial de aplicação em biorremediação de água do mar contaminada por óleo diesel. Trabalhos publicados na literatura sobre cepas de *Y.lipolytica* tolerantes a sais ratificam o papel significativo que pode ser exercido por esta levedura em ambientes marinhos e hipersalinos (Butinar et al.2005; Kim et al. 2007; Zinjarde et al. 2008).

Os resultados de produção de biomassa, atividade de emulsão, redução da tensão superficial e tolerância ao sal obtidos neste trabalho, usando *C.lipolytica* UCP 0988, poderiam ser considerados muito satisfatórios, quando comparados com os resultados obtidos por outros microorganismos que degradam o óleo diesel cultivados em água do mar e outros meios (Bento et al, 2005, Huang et al, 2008, Miranda et al, 2007, Murkeji et al, 2004, Pirrolo et al, 2008) e com os resultados obtidos por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 cultivados em óleo em água artificial (Zinjarde, Pant, 2002). A significância dos resultados aumenta especialmente quando se considera a curta

duração (96h) do processo de biodegradação e que a *C.lipolytica* UCP 0988 não foi aclimatada ao sal ou ao óleo diesel.

Neste estudo, culturas puras de *C.lipolytica* UCP 0988 crescidas sobre óleo diesel em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato de potássio apresentaram maior tolerância a altas salinidades que alguns consórcios. A habilidade do consórcio ES1 utilizar óleo diesel como única fonte de carbono e tolerar de moderada a alta concentração de sal em um intervalo de 0-5% de salinidade foi investigada por Murkeji et al, (2004). Culturas aclimatadas ao sal puderam tolerar salinidades acima de 3,5% de NaCl e degradação significativa de óleo diesel (29%) foi observada, embora máximo crescimento e degradação de óleo diesel tenham ocorrido em salinidade de 0,5%, onde a extensão da degradação de óleo diesel foi significativamente superior (61% em 15dias) que em 0% de NaCl. Em concentrações de sal superiores a 4% e 5% a perda de diesel foi comparada aquelas no controle (13% e 11%, respectivamente). Em um estudo similar com um consórcio bacteriano desenvolvido para utilizar várias frações de petróleo bruto, Kapleyetal.(1999) demonstraram que as culturas podiam tolerar até 3%NaCl, sem qualquer alteração no crescimento após 48 h. Os autores relatam que o crescimento de cultura e a utilização de hidrocarbonetos a partir de petróleo bruto ocorreram em salinidades de até 6% com transformação genética dos organismos usando o *ProUoperon*, um importante locus osmorregulatório.

Em todos os ensaios realizados no presente estudo (Tabela 2) redução significativa de pH foi observada. Este resultado pode estar relacionado a formação de ácidos orgânicos, que podem provocar a redução da medida do pH na fase

aquosa, durante a degradação de hidrocarbonetos (Bento et al, 2005). Além da formação de ácidos orgânicos, a redução do pH pode estar relacionada a lises celulares, produtos poliméricos (Miranda et al, 2007, Bucker, 2011) e a formação de outros sub-produtos (Rhaman et al , 2003). Em processo de biorremediação, é necessário que o pH seja compatível com os micro-organismos. Bactérias desenvolvem-se com um pH ótimo entre 5 e 9, enquanto que os fungos que degradam compostos complexos tem o pH ótimo de 5 ou menos (Skaladany e Metting,1993). Enzimas são polímeros de aminoácidos e suas atividades requerem um grau de protonação adequado dos aminoácidos. Este processo é controlado pelo pH. O pH ótimo para a ação dos micro-organismos é usualmente próximo da neutralidade, mas muitos micro-organismos presentes em aquíferos podem agir sem prejuízos de suas funções para valores de pH entre 5 e 9 (Corseuil e Alvarez, 1996). Os valores finais do pH (Tabela 2) nos ensaios realizados com valores iniciais de pH iguais a 6, 10 e 14, variaram respectivamente dentro dos seguintes intervalos: 5,61 e 5,91; 6,94 e 8,90 e 8,09 e 11,16. No presente trabalho, a mais alta produção de biomassa ( $33,80 \pm 1,68$  g/L) foi obtida com 96 h, em pH aproximadamente 8 ( $7,64 \pm 0,92$ ), no ponto central do planejamento. Este resultado está de acordo com estudo publicado por ZinjardeePant(2002), no qual relatam que a melhor produção de biomassa ocorreu em pH 8,0, que é o pH natural da água do mar (*habitat* natural de *Y.lipolytica*).

Simulação em laboratório de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* LBI em água contaminada por petróleo e derivados em diversas concentrações foi realizada por Piróllo et al (2008). Quando o óleo diesel foi utilizado como substrato para crescimento, a biomassa aumentou em todos os experimentos, mostrando a

capacidade do micro-organismo para degradar este combustível. A maior produção de biossurfactantes (9,9 g/L) foi obtida usando óleo diesel a 30% (p/v) e a maior produção de biomassa foi alcançada usando óleo diesel na concentração de 20%. Este resultado foi semelhante ao obtido no presente trabalho, onde *C.lipolytica* UCP 0988 apresentou maior produção de biossurfactante (maior redução de tensão superficial) usando o óleo diesel a 30% (v/v) e maior produção de biomassa, no ponto central do planejamento usando óleo diesel a 20%.

Embora existam na literatura muitos estudos sobre biodegradação de petróleo por diversos micro-organismos em água e em solo, não existem muitos trabalhos específicos sobre biodegradação de derivados de petróleo (como óleo diesel e querosene) em água do mar por culturas puras e consórcios. O número de trabalhos acadêmicos envolvendo biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C.lipolytica* é mais restrito ainda.

Um planejamento fatorial 2<sup>4</sup> foi realizado durante 168 h por Souza et al. (2012), para avaliar - em meios com pH ajustado em 5,3 - os efeitos e interações das concentrações de óleo diesel (1, 3 e 5%), uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial em processo de biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988 in seawater. Altas atividades de emulsificação (superiores a 5,4 UAE) 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. Entretanto, é importante notar que a média ( $45,10 \pm 4,75$  mN/m) das tensões superficiais, obtida com 96h nos 20 ensaios (com concentrações de óleo diesel de 10, 20 ou 30%) do presente trabalho, foi 8,85% menor que a média das tensões superficiais obtidas com 168h nos 20 ensaios realizados por Souza et al. (2012).

De acordo com a literatura, micro-organismos que reduzem a tensão superficial a 40 mN/m ou menos, são considerados bons produtores de biossurfactantes (Cooper, 1986, Habba et al., 2000; Mariano et al, 2008). Portanto, quando cresceu sobre óleo diesel a 30% nas condições do ensaio 4 (Tabela 2) do presente trabalho, durante 96 h, a levedura *C.lipolytica* UCP 0988 produziu um excelente biossurfactante, que reduziu a tensão inicial do meio em 37,06%, baixando a tensão superficial para 34,13 mN/m. Entretanto, outros ensaios do PFC apresentaram redução de tensão superficial superior a 25% e tensões superficiais com 96h acima de 39mN/m, sugerindo o uso de redução de tensão superficial maior ou igual a 25% como um indicador indireto de produção de biossurfactantes. Os resultados obtidos sugerem que não existe relação direta entre baixa tensão superficial e alta atividade de emulsificação ou entre baixa tensão superficial e alta produção de biomassa.

Alguns estudos sobre a produção de emulsificantes por *C.lipolytica* UCP 0988 em meio contendo água do mar diluída a 50% - usando óleo de babaçu (Vance-Harrop et al, 2003) ou óleo de milho (Albuquerque et al, 2006) como fonte de carbono – corroboram os resultados obtidos neste trabalho sobre a influência do fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação. 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.

Os efeitos de mudanças nos níveis de fatores ambientais, tais como pH e fontes de carbono, nitrogênio e fósforo sobre biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes por leveduras em ecossistemas marinhos, ainda não estão completamente entendidos. Portanto, o modelo desenvolvido no presente trabalho fornece um método simples e efetivo para simular a concentração de biomassa em processo de biodegradação de óleo diesel em água do mar por *C.lipolytica* UCP 0988, usando condições iniciais de pH e concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Outra importante contribuição deste estudo é a identificação da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 como micro-organismo com potencial para utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia e produzir biossurfactantes/bioemulsificantes em água do mar hipersalina e ácida ou extremamente alcalina, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

## 5. Conclusão

Modelagem empírica e simulação são ferramentas essenciais para o melhoramento e otimização de bioprocessos. O modelo baseado em metodologia de superfície de resposta desenvolvido nas condições estudadas neste trabalho, provou ser um método efetivo para simular a concentração de biomassa, em processo de biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 0988 em água do mar, usando valores iniciais de pH e de concentrações de óleo diesel, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Teste para curvatura confirmou a proximidade do ponto ótimo e a necessidade de implementação de um planejamento composto central, dentro de uma estratégia sequencial de otimização. Subsequentemente, modelos mais avançados serão aplicados para otimizar o processo.

## Agradecimentos

A Fundação para Amparo da Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, FACEPE (Processo nº PBPG-1009-3.06/09) pelo suporte financeiro e a Universidade Católica Pernambuco pelo uso das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB).

## 6. Referências

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1323-1336.
- 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. *Canadian Journal of Microbiology*, 6, 575-583.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi I.; Batestti, G., Martinotti, M.G., Frachia, L., Smith, T.J., Marchant, R. , 2010. Microbial surfactant production, applications and future potential. *Applied Environmental Microbiology* 87, 427-444.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.; Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soil by natural attenuation, bioestimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96, 1049-1055.
- Bücker, F., Santestevan, N.A., Roesch, L.F. Jacques, R.J.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., Bento, F.M., 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodet. Biodeg.*, 65, 172-178.
- Butinar, S.S., Spencer-Martins, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N., 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett.*, 244, 229–234.
- Chrzanowski, L., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2006. The ability of *Candida maltosa* for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 1, 47-51.
- Cirigliano, M. C. and Carman, G. M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 747-750.
- Cooper, D.G., 1986. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.*, 3, 145-149.

Corseuil, H. X., Alvarez, P. J. J., 1996. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. *Wat. Sci. Tech.*, 34, 311 - 318.

Darvishi, P., Shahab, A., Mowla, D., Niazi, A., 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 292-300.

Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*. Article ID: 941810. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/941810>.

Gomes, E.B., Soriano, A.U., Miranda, R.C.M., Sousa, M.F.V.Q, Pereira Jr., N., 2009. Biodegradation of Stored jet Fuel by a *Nocardia sp.* Isolated from Contaminated Soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 ,1279-1284.

Haba, E.; Espuny, M. J.; Busquets, M.; Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 379-387

Hassanshahian, M., Tebyanian H., Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32 from the Persian Gulf, *Marine Pollution*, 64, 7, 1386-1391.

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

Horowitz, A.;Gutnick, D. Rosenberg, E., 1975. Sequential Growth of bacterial on Crude Oil. *Applied Microbiology* 30, 10-19.

Huang,L., Ma,T., Li, D., Liang,F-I, Liu, R-L, Li, G-q, 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradationby *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1714–1718.

Ijah, U.J.J., 1998. Studies on relatives capabilities of bacterial and yeastisolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Manage*, 18, 293.

Johnsen, A.R., Karlson, U., 2004 Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 452-459.

Kaczorek, E., Olszanowski, A. 2011. Uptake of hydrocarbon by *Pseudonima fluoresces* (P1) and *Pseudonomas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: a cell surface modification. *Water, Air, Soil Pollution* 214, 451 - 459.

Kapley, A., Purohit, H.J., Chhatre, S., Shanker, R., Chakrabarti, T., Khanna, P., 1999. Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 67, 241–245.

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

Kumari, M., Abraham, J., 2011. Biodegradation of Diesel Oil using yeast. *Research Journal of Environmental Toxicology* 5, 369-377.

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

Márquez-Rocha, F.J.; Hernández-Rodríguez, V.; Lamela, M.T., 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air and Soil Pollution*, 128, 3 - 4, 313 – 320.

Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. F., Pirôllo, M. P. S., Contiero, J., 2008. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25, 269-274.

Miranda, R. C.; Souza, C. S.; Barros Gomes, E; Lovaglio, R. B.; Carlos Edison Lopes, C. E.; Sousa, M. F. V. Q., 2007. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco -Brazil *Brazilian archives of Biology and technology*, 50, 147-152.

Mohanty, G.; Mukherji, S., 2008. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 240-250.

Montgomery Douglas C., 2005. *Design and Analysis of Experiments Response Surface Method and Designs* (New Jersey, John Wiley and Sons, Inc).

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

Pacwa-Plociniczak, M.; Plaza, G. A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S. S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol.Sci.* 12, 633-654.

Pirôllo, M. P. S.; Mariano, A. P.; Lovaglio, Costa; R. B. S.G.V.A.O.; Walter, V.; Hausmann, R.; Contiero, J., 2008. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*

LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1484–1490.

Prince, R.C, Gramain, A., McGenity, T.J., 2010. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.M. Ed., *Handbook of Hydrocarbon and lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1672-1692.

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I. M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technol.*, 90, 159 - 168.

Reisfeld, A., Rosenberg, E., Gutnick, D., 1972. Microbial degradation of crude oil: Factors affecting the dispersion in seawater by mixed and pure culture. *Applied Microbiology*, 24, 363 - 368.

Sklandany, G.J., Metting, 1993. Jr., F.B. Bioremediation of contaminated soil.. In: Metting Jr, F.B. (ed.) *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, Inc. New York. 646, 483 –513.

Sood , N., Lal, B., 2009. Isolation of a novel strain yeast *Candida digboiensis* TER1 ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acid conditions. *J. Environ. Manage*, 90, 1728-1736.

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

Thavasi, R.; Jayalakshmi, S.; Balasubramanian, T.; Banat, I.M. 2006. Biodegradation of crude oil by nitrogen fixing marine bacteria *Azotobacter chroococcum*. *Research Journal of Microbiology* 1(5): 401 - 408.

Vance-Harrop, M. H.; Buarque-Gusmão, N.; Campos-Takaki, G. M., 2003. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 120 - 123.

Xia, W. X.; Li, J. C.; Zheng, X. L.; Bi, X. J.; Shao J. L., 2006. Enhanced Biodegradation of Diesel Oil in Seawater Supplemented with Nutrients. *Engineering in life Sciences*, 6, 1, 80 – 85.

Xia W, Li J, Xia Y, Song Z, Zhou J., 2012. Optimization of diesel oil biodegradation in seawater using statistical experimental methodology. *Water Sci Technol.*, 66, 1301-1309.

Zhou Q. Kosaric N., 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactants with *Candida bombicola*. J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 1, 89–91.

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

# Capítulo 3

## CONCLUSÕES GERAIS

- A metodologia de superfície de resposta mostrou ser uma ferramenta eficaz para modelagem de concentração de biomassa em processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar adequadamente suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.
- A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 tem potencial para utilizar óleo diesel em concentrações de 10, 20 e 30% (v/v) - como única fonte de carbono e energia - e produzir biossurfactantes e bioemulsificantes em água do mar.
- A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 apresenta tolerância a ambientes extremos, sendo capaz de biodegradar óleo diesel e produzir biossurfactantes e bioemulsificantes em água do mar hipersalina e ácida ou extremamente alcalina.

# ANEXOS

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

Elsevier Editorial System™ - Windows Internet Explorer

http://ees.elsevier.com/bite/default.asp

**BIORESOURCE TECHNOLOGY**

Contact us Help ?

ELSEVIER

Username: cdaisy@unicap.br

Role: Author

>> Maintenance outage on 24 February 2013 ... [more](#)

>> Can't complete consolidation? [Read more...](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Version: EES 2012.2

---

**Submissions Being Processed for Author Clarissa Daisy Costa Albuquerque, Ph.D**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		Biomass concentration modelling and study of the effects of pH and nutrients on biodegradation process of diesel oil by Candida lipolytica UCP 0988 in seawater	Feb 22, 2013	Feb 22, 2013	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

---

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#)

Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.  
Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

Iniciar

15:19  
22/02/2013

Elsevier Editorial System™ - Windows Internet Explorer

http://ees.elsevier.com/bite/default.asp

**BIORESOURCE TECHNOLOGY**

Contact us Help ?

ELSEVIER

Username: cdaisy@unicap.br

Role: Author

>> Maintenance outage on 24 February 2013 ... [more](#)

>> Can't complete consolidation? [Read more...](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Version: EES 2012.2

---

**Author Main Menu**

**New Submissions**

- [Submit New Manuscript](#)
- Submissions Sent Back to Author (0)
- Incomplete Submissions (0)
- Submissions Waiting for Author's Approval (0)
- [Submissions Being Processed](#) (1)

**Revisions**

- Submissions Needing Revision (0)
- Revisions Sent Back to Author (0)
- Incomplete Submissions Being Revised (0)
- Revisions Waiting for Author's Approval (0)
- Revisions Being Processed (0)
- Declined Revisions (0)

**Completed**

- Submissions with a Decision (0)

---

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#)

Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.  
Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

Iniciar

15:21  
22/02/2013

# **Normas da Revista Bioresource Technology**



### TABLE OF CONTENTS

---

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



ISSN: 0960-8524

### DESCRIPTION

---

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

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

Topics include:

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

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

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

### AUDIENCE

---

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

### IMPACT FACTOR

---

2010: 4.365 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

### AGRICOLA

Agricultural Engineering Abstracts

Analytical Abstracts (Royal Society of Chemistry Information Services)

### BIOSIS

Biology and Environmental Sciences

CAB Abstracts

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

### EMBASE

Ecological Abstracts

Energy Information Abstracts

Energy from Biomass and Municipal Wastes

Engineering Index

Environmental Periodicals Bibliography

Forestry Abstracts

Fuel and Energy Abstracts

### GEOBASE

Gas Abstracts

### SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

Selected Water Resources Abstracts

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

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

### *Editor*

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

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

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

### *Associate Editors*

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

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

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

### *Editorial Board*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

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

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

Topics include:

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

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

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

#### *Types of paper*

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

#### *Submission of papers:*

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

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

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

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

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

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

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

#### *Conflict of interest*

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

### **Submission declaration and verification**

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

### **Changes to authorship**

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

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

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

### **Copyright**

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

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

### **Retained author rights**

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

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

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

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

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

### **Open access**

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

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

#### *Language and language services*

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

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

#### **Submission**

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

#### *Submit your article*

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

#### *Referees*

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

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

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

#### **PREPARATION**

##### *Manuscript Preparation*

##### *General:*

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

##### *Structure:*

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

##### *Text Layout:*

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

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

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

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

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

#### ***LaTeX***

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

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

#### ***Article structure***

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

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

##### ***Introduction***

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

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

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

##### ***Experimental***

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

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

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

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

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

### Conclusions

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

### Appendices

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

### Essential title page information

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

### Abstract

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

### Graphical abstract

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

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

### Highlights

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

### Keywords

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

### Abbreviations

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

### Acknowledgements

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

### Units

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

### Math formulae

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

### Footnotes

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

#### Table footnotes

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

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

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

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

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

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

##### Formats

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

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

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

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

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

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

##### Please do not:

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

##### Color artwork

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

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

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

#### *Figure captions*

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

#### *Tables*

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

#### *References*

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

#### *Citation in text*

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

#### *Web references*

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

#### *References in a special issue*

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

#### *Reference style*

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

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

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

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

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

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

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

#### Reference to a book:

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

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

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

#### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

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

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

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

#### Video data

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

#### Supplementary data

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

#### Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an Identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

#### Submission checklist

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

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

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

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

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

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

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

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

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

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

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

### *Publication of Articles*

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

### *Proofs*

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

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

### *Offprints*

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

## AUTHOR INQUIRIES

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



**Artigo submetido à Revista Bioresource  
Technology**

**Biomass concentration modelling and study of the effect of pH and nutrients on biodegradation process of diesel oil by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater**

Maria Luísa Oliveira Mergulhão Freitas Henriques<sup>a</sup>, Galba Maria de Campos-Takaki<sup>a,b</sup>,  
Clarissa Daisy Costa Albuquerque<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Almeida Cunha, 245, Bloco G4, 8º andar, 50.050-480, Boa Vista, Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, 50050-590, Boa Vista, Recife, PE, Brasil.

**\*Corresponding Author:**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia  
Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo,  
50050-590, Boa Vista, Recife, PE, Brasil.

Phone: +55-81-21194017

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

## ABSTRACT

*Candida lipolytica* UCP 0988 was able to grow in seawater supplemented with sources of nitrogen and phosphorus, and to use diesel oil as sole carbon source. A 2<sup>4</sup> factorial design was carried out to evaluate the effects and interactions of initial pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and monobasic potassium phosphate on biomass concentration surface tension, emulsifying activity, salinity and pH at 96h, indiesel oil biodegradation process. The biomass concentrations varied between 7 and 36 g/L and the surface tension reductions between 8 and 37%. A biomass concentration model as a function of pH and concentrations of diesel, ammonium sulfate, monobasic potassium phosphate was developed using response surface methodology. A high coefficient of determination ( $R^2= 0.9544$ ) and a low p-value ( $p<0.05$ ) confirm the statistical significance of the model. The non-significant lack-of-fit value ( $p>0.05$ ) suggest the adequacy of the model to explain data in the studied conditions.

**Keywords:** Response surface methodology; Biodegradation; Diesel oil; Biosurfactant; Marine bioremediation.

## 1. Introduction

Global demand for energy from fossil fuels has contributed to the increasing potential risk of contaminations of seas and oceans by oil and oil products. Due to its intensive use for passenger and cargo transportation by land and sea, the diesel oil is one of the most-consumed fuels in the world and although on a smaller scale than the petroleum, has caused marine pollution by hydrocarbons and serious environmental, social and economic problems. The monitoring, optimization and control of natural resources and cycles of life of chemical, petrochemical and biotechnological processes and products, aiming the preservation of the environmental quality, is one of the great challenges of this millennium.

Several physical, chemical and biological methods are available for individual or integrated application in remediation of oceanic environments contaminated with hydrocarbons. Microbial bioremediation is an alternative, environmentally-friendly and cost-effective technology, in which biodegradation processes have been used to convert organic contaminants into energy, cell mass and non-toxic or less harmful substances to the environment.

Microorganisms like bacteria, yeasts and filamentous fungi are known have ability to degrade hydrocarbons (Leahy and Colwell, 1990) and produce biosurfactants (Abdel-Mawgoud et al., 2010). The production of biosurfactants is the microbial response to the limited bioavailability of hydrophobic organic compounds (Banat et al., 2010; Johnsen and Karlson, 2004; Darvish et al. 2011, Pacwa-Plociniczak et al., 2011). According to many authors, bacteria are more efficient hydrocarbon degraders than yeasts.

However, there is also information from yeasts that degrade hydrocarbons better than bacteria (Ijah, 1998, Chrzanowski et al., 2006).

The effectiveness of the hydrocarbon degradation in the marine environment is influenced mainly by: (i) type and concentration of hydrocarbon; (ii) initial concentration of microorganisms (biomass) with enzymatic capacity for degradation of complex hydrocarbons; (iii) availability of hydrophobic organic compounds for the microorganisms; (iv) dissolved oxygen availability in seawater and (v) concentration of nitrogen and phosphorus in seawater (Reisfeld et al., 1972; Leahy and Colwell, 1990; Marquez-Rocha et al, 2001, Xia et al, 2006; Prince et al., 2010; Xia et al, 2012). There are many others external environmental factors that affect the biodegradation and also biosurfactant production in sea water, for example: pH, salinity, temperature and pressure (Reisfeld et al., 1972; Leahy and Colwell, 1990; Zinjarde and Pant, 2002).

Therefore, in marine environment, due to low levels of nitrogen and phosphorus in seawater, it generally is necessary identify the adequate concentrations of these nutrients to enhance the hydrocarbon biodegradation. The addition of microorganism (s) - with appropriate metabolic capabilities to confront highly stressful environmental conditions - it is also fundamental to obtain fast and effective biodegradation of hydrocarbon in seawater (Xia et al, 2006; Huang et al, 2008, Prince et al., 2010; Das, Chandran, 2011, Xia et al, 2012) .

Researches have shown that *Yarrowia lipolytica* strains degrade petroleum efficiently in seawater (Zinjarde, Pant, 2002; Hassanshahian et.al., 2012). Studies carried out with pure cultures of *Candida lipolytica* UCP 0988, ratify the potential of this yeast to grow and produce biosurfactants/bioemulsifiers in seawater, supplemented with

nitrogen and phosphorus sources, using diesel oil as the only carbon source (Souza et al, 2012).

In general, microbial consortia perform more extensive degradation than pure cultures. However, the development of consortium for effective biodegradation hydrocarbons is directly related to specificities and biodegradation efficiencies of the pure cultures involved (Reisfeld et al., 1972; Horowitz et al., 1975; Mohanty, Mukherjy, 2008, Kaczorek, Olszanowski, 2011).

Response Surface Methodology (RSM) is a collection of mathematical and statistical techniques for empirical model building, in which a response of interest is influenced by several variables and the objective is to optimize this response (Montgomery 2005). Statistical experimental designs associated to RSM have been successfully applied to improve the performance of biosurfactant production (Albuquerque et al., 2006) and hydrocarbon biodegradation processes in seawater (Xia et al., 2006; Xia et al., 2012).

In current work, the ability of the yeast *C. lipolytica* UCP 0988 degrade diesel oil, in seawater supplemented with ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate, was investigated through a  $2^4$  full factorial design (FFD) combined with RSM. A model to estimate the biomass concentration as a function of pH and of the concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate was developed, as the first step of a sequential optimization strategy of diesel oil biodegradation process by *C.lipolytica* UCP 0988 in seawater. The effects of independent variables on the response variables were analysed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganism

*Candida lipolytica* UCP 0998 was obtained from the culture collection of Nucleus of Research in Environmental Sciences of the Catholic University of Pernambuco, Brazil. The yeast was maintained at 4°C in agar YMA with the following composition: 3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 10 g/L D-glucose, 5 g/L tryptone, 15 g/ agar and pH 5. Transfers were made to agar slants each month to maintain viability.

### 2.2. Diesel Oil

Petrobras diesel oil, B5 metropolitan type (5% biodiesel, 95% petroleum diesel), maximum of 0.05% sulphur. It contains paraffinic, naphthenic and aromatic hydrocarbons (10 to 40% v/v)., impurities of nitrogenous compounds and oxygenated compounds and additives.

### 2.3. Seawater

The seawater was collected from beach (9° 36' 59" S; 35° 1' 36" W) near Suape's industrial port complex, Pernambuco, Brazil. Its ionic composition was Ca<sup>+</sup> + 0.48 ‰; Mg<sup>+</sup> + 1.36 ‰; Na<sup>+</sup> 11.20 ‰; K<sup>+</sup> 0.55 ‰; Cl<sup>-</sup> 20.00 ‰; SO<sub>4</sub><sup>-</sup> 3.27 ‰. The salinity,

specific gravity, pH and surface tension were equal to 43‰; 1035 kg/m<sup>3</sup>, 7.19 and 49.6 mN/m, respectively.

## 2.4. Analytical Determination

Samples were withdrawn during 4 days for analyses of biomass concentration, pH, salinity, specific gravity, surface tension and emulsification activity for emulsions water-in-corn oil (EWO). Biomass concentration was determined by the dry weight method, according to Zhou and Kosaric (1995). The pH was determined by potentiometry and salinity and the specific gravity were determined by refractometry. The surface tension was measured by the du Noüy ring method. The emulsification activity of free-cell broth was determined following the method described in Cirigliano e Carman (1984). The method defines one unit of emulsification activity (UEA) as the amount of emulsifier that resulted an emulsion with an absorbance of 1.0 at 540nm.

## 2.5. Factorial Design of the Diesel Oil Biodegradation Tests

Biodegradation of diesel oil by *Candida lipolytica* in natural seawater, supplemented with nitrogen and phosphorus sources, using diesel oil as a sole carbon source was investigated. A 2<sup>4</sup> FFD was carried out to investigate the effects and interactions of the initial pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate (nitrogen source) and potassium monobasic phosphate (phosphorus source) on the final values of biomass concentration, surface tension, pH and salinity. The levels and ranges of the factors (independent variables) are given in Table 1 and were selected according to

preliminary experiments (Souza et al, 2012). A total of 20 assays. was carried out, including four replicates at the center point. The replicates were used to provide an estimate of pure error and also to check for curvature.. The experiments were performed in random order to avoid that atypical deviations become associated with certain level combinations.

The constituents of the biodegradation media were weighed and dissolved in sea water and the pH was adjusted according to the specifications in Table 1. The media were autoclaved at 120°C for 20 minutes, in Erlenmeyer flasks of 1000 mL. The inoculum was obtained from a pure culture of *C. lipolytica* CPU 0988 maintained at 28° C for 48 h. The inoculation was performed in a laminar flow cabinet (biological safety cabinet), in proportion of 5% of the working volume, using suspension of 10<sup>6</sup> cells/mL.

The diesel oil was autoclaved in steam flowing and added to the media, according to the specifications of the design. The flasks with working volume of 750 mL were incubated on a rotatory shaker for 96 h, with the temperature controlled at 28° C and agitation at 200 rpm.

## 2.6. Response surface methodology

Response Surface Methodology (RSM) associated with 2<sup>4</sup> FFD was used to develop a first-order model for biomass concentration ( $y$ ), having as independent variables: the initial pH ( $x_1$ ) and the initial concentrations of diesel oil ( $x_2$ ), ammonium sulfate ( $x_3$ ) and potassium monobasic phosphate ( $x_4$ ). The general form of model is given by the following equation:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^4 a_i x_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 a_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

where,  $y$  is the response variable;  $a_0$  is the intercept,  $a_i$  and  $a_{ij}$  are the coefficients of the regression of the model and  $x_i$  and  $x_j$  are independent variables.

The data experimental of the  $2^4$  FFD were subjected to regression analysis and the analysis of variance (ANOVA) with 95% confidence limits. The quality of the fit of the polynomial model was expressed by the coefficient of determination  $R^2$  and its statistical significance was tested by Fisher's F-value. The significance of each regression coefficient and effect estimate was determined by Student's  $t$ -test and  $p$ -value. Pareto charts - with a significance level of 95% - were employed to illustrate the standardized effects estimates of the factors on the response variables. The length of each bar on a standardized Pareto chart is proportional to the absolute value of its associated regression coefficient or estimated effect. Each effect is converted to a  $t$ -statistic by dividing it by its standard error. The standardized effects are plotted in decreasing order of absolute magnitude. The chart includes a vertical dashed line indicating statistical significance. An effect is considered significant if it crosses this line ( $p = 0.05$ ). Three-dimensional graphical representations were generated to evaluate visually the effects and interactions of the factors on the response variables. The statistical analysis was carried out using STATISTICA® software, version 8.0 (Statsoft. Inc, Tulsa / OK, USA).

### 3. Results

The 2<sup>4</sup> FFD matrix and the results - with 96 h - of the response variables - pH, salinity, biomass, surface tension and emulsification activity for EWO- are shown in Table 2.

#### 3.1. Identification of the best media for biodegradation of diesel oil by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater

The media that presented the best conditions for biodegradation of diesel oil by *Candida lipolytica* UCP 0988 in seawater are presented in Table 3 and Fig. 1. The highest biomass concentration ( $33.80 \pm 1.68$  g/L) was obtained with 96 h at the center point condition of the FFD (Fig. 1a), in a medium containing seawater supplemented with 0.68 g/L of ammonium sulfate and 1.36 g/L monobasic potassium phosphate, initial pH 10 and diesel oil as sole carbon source (20% of working volume). In this media, the emulsification activity for EWO was equal to 5.55 UAE and the average reductions of surface tension, pH and salinity were equal to 30.32, 23.65 and 5.69% respectively. The average surface tension reduction at the center point, with initial pH 10, was superior to the average surface tension reduction in the media with initial pH 6 (21.51%) and 14 (12.41%). However, the greatest reduction in surface tension (37.06%) was found to occur in assay 4 (Fig. 1b), in a medium with initial pH 14, biomass concentration equal to 14 g/L, emulsification activity for EWO equal to 5.32 UAE and reductions of pH and salinity equal to 36.86% and 0% respectively. The average biomass in the media with initial pH 14 was equal to  $16.3 \pm 7.6$  g/L. The three others highest biomass concentrations (30.8, 24.0 and 16.0 g/L) at this pH occurred

in the assays 16, 12 and 10, with diesel oil concentrations equal to 30, 30 and 10% respectively. Assays carried out at pH 6, showed good biomass production ( $12.4 \pm 3.2$  g/L). Moreover, the assay 5 with initial pH 6 and final biomass equal to 13.4g/L (Fig.1c) and the assay 14 with an initial pH 14 and final biomass equal to 13.8g/L (Fig.1d) showed the highest emulsification activities for EWO (6UAE). The reductions of surface tension, pH and salinity achieved in 96 hours for the assay 5, were equal to 25.71, 4.17 and 35.29%, respectively, while for the assay 14 they were equal to 2.53; 36.86 and 4.41%, respectively. This information are summarized in Table 3.

### 3.2. Biomass Concentration Modeling

A first order model including second-order interactions and curvature check, was developed by the application of RSM to data and results of the  $2^4$  FFD (Table 2). The regression analysis produced the following equation:

$$y = \mathbf{22.07375} - 0.92312 * x_1 - \mathbf{0.68187} * x_2 + 4.88750 * x_3 - \mathbf{8.28493} * x_4 + \\ + \mathbf{0.03906} * x_1 * x_2 - 0.20625 * x_1 * x_3 + \mathbf{0.55607} * x_1 * x_4 - 0.08750 * x_2 * x_3 + \\ + \mathbf{0.35846} * x_2 * x_4 + 0.77206 * x_3 * x_4 \quad (2)$$

where,  $y$  is the biomass concentration;  $x_1$  is the pH,  $x_2$  is the diesel oil concentration,  $x_3$  is the ammonium sulfate concentration and  $x_4$  is the potassium monobasic phosphate concentration. Only the values of regression coefficients shown in bold face are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

The analysis of variance (Table 4) shows that the model is statistically significant ( $p < 0.05$ ) and predictive, as is evident from the Fisher F test, where the calculated F value is approximately five times greater than the tabular F value. The high value of the determination coefficient ( $R^2 = 0,9544$ ) indicates that 95.44 % of the variability in the data is explained by the model. The correlation coefficient ( $R = 0.9769$ ) indicates an excellent correlation between the experimental and predicted values. The value of the adjusted determination coefficient ( $Adj R^2 = 0.8917$ ) also is high, ratifying a significance of the model. This ensure a satisfactory ajustement of the model to the experimental data. The Lack of Fit (LOF) F-value of 0.1057 implies the LOF is not significant relative to the pure error ( $p > 0.05$ ). Therefore, the proposed model is adequate to described the observed data. The estimated responses at 20 experimental points are presented in Table 2. Curvature check confirmed the proximity of the optimum point and need of implementation - within a sequential optimization strategy - of a central composite design and a quadratic model that better incorporates the effect of curvature.

The three-dimensional response surfaces for biomass concentration plotted using Eq (2) are showed in Fig.2, corresponding to the combined effects of: pH and concentration of diesel oil (Fig. 2a); pH and concentration of ammonium sulfate (Fig. 2b); pH and concentration of potassium monobasic phosphate (Fig. 2c); concentration of diesel oil and concentration of ammonium sulfate (Fig. 2d); concentration of diesel oil and concentration of potassium monobasic phosphate (Fig. 2e) and concentration of ammonium sulfate and concentration of potassium monobasic phosphate (Fig. 2f). These surfaces allow to visualize the conditions that lead to higher biomass production.

It can be easily observed that the increase in pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate favor the increase of biomass concentration.

### **3.3. Effects of the initial pH and initial concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic on the biomass concentration**

In all assays there was a high production of biomass. The strong influence of the pH on the diesel oil biodegradation in seawater by *C. lipolytica* UCP 0988 can easily be seen in the results presented in Table 2. The biomass concentration at 96 h varied between 7.0 and 15.8 g/L in the assays with initial pH 6 and between 8.4 and 30.8 g/L in the assays with initial pH 14 (Table 2). In accordance with the Pareto chart (Fig. 3a), for a confidence level of 95%, it is possible to verify that the increase of the concentration of potassium phosphate monobasic, its interaction with the diesel fuel and the increase of pH 6 to 14 were the factors that most influenced the increase of biomass concentration, exerting statistically significant positive effects on its increase and consequently on the biodegradation of diesel oil. The pH interactions with the potassium monobasic phosphate and with the diesel oil and the increase of the concentration of diesel oil favored, with statistical significance, the increase of the biomass production. The increase of the concentration of ammonium sulfate and its interactions with the other factors did not exert statistically significant effects on the concentration of biomass.

### **3.4. Effects of the initial pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic on the surface tension**

Surface tension at 96h varied between 45.76 and 54.56 mN/m in the assays with initial pH 6 and between 34.13 and 48.53 mN/m in the assays with initial pH 14 (Table 2). The averages of the surface tensions of the assays with initial pH 6, 10 and 14 were respectively equal to  $48.63 \pm 3.34$ ,  $41.64 \pm 2.84$  and  $42.55 \pm 4.86$  mN/m. For the same concentrations of ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate, the media with pH 14 showed lower surface tensions than those with pH 6. The increase in the initial pH of 6 to 14 favored the reduction of surface tension of the media, exerting a statistically significant negative effect on the increase of surface tension (Fig. 3b). Other factors and interactions did not have statistically significant effects on the reduction of surface tension.

### **3.5. Effects of the initial pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic on the emulsification activity for EWO**

The emulsification activity for EWO at 96 h varied between 3.15 and 5.93 UAE in the assays with initial pH 6 and between 5.32 and 6.00 UAE in the assays with initial pH 14 (Table 2). The averages of the emulsification activities of the assays with initial pH 6, 10 and 14 were respectively equal to  $4.98 \pm 1.14$ ,  $5.55 \pm 0.02$  and  $5.65 \pm 0.22$  UAE. The increase in the emulsification activity for EWO was favored with statistical significance by the increase in the pH and by its interaction with potassium phosphate monobasic; by the increase in the concentration of ammonium sulfate and by its

interaction with the diesel oil and by the increase in the concentration of diesel oil (Fig. 3c). On the other hand, the interaction of diesel oil with potassium monobasic phosphate, the increase of the concentration of potassium monobasic phosphate and the interactions of the pH with the ammonium sulfate and with the diesel oil exerted statistically significant negative effects on the increase in activity emulsification for EWO.

### **3.6. Effects of the initial pH and initial concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic on the salinity**

The salinity com 96h varied between 55 and 67 ‰ in the assays with initial pH 6 and between 47 and 65‰ in the assays with initial pH 14 (Table 2). The averages of the salinity of the assays with initial pH 6, 10 and 14 were respectively equal to  $58.75 \pm 3.99$  ;  $57.4 \pm 0.50$  e  $57 \pm 6.63$  ‰. The only factor which contributes to the increase of the final salinity was the increase of the concentration of potassium phosphate monobasic (Fig. 3d). Moreover, the increase of the concentration of ammonium sulfate and the interactions of the diesel oil with the potassium monobasic phosphate, of the pH with the diesel oil, of the diesel oil with the ammonium sulfate, of the ammonium sulfate with the potassium phosphate monobasic; and the increase of the pH, in this order, contributed with statistical significance to reduce the salinity of media. The increase of the diesel oil concentration and the interactions of the pH with the ammonium sulfate and with the potassium phosphate monobasic did not exert statistically significant effects on the salinity.

#### 4. Discussion

The first stage of a sequential optimization strategy for biodegradation of diesel oil in seawater by *C. lipolytica* UCP 0988 was carried out using a  $2^4$  FFD associated with response surface methodology to investigate the effects of initial pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate (Table 1) on biomass production, surface tension, emulsifying activity, salinity and pH with 96 hours.

Among the various environmental conditions (pH and concentrations of diesel oil, ammonium sulfate and potassium phosphate) investigated, those identified as being the best for biodegradation of diesel oil in seawater by *C. lipolytica* UCP 0988 are presented in Table 3. The conditions 4, 5, 14 and 17 (center point) produced respectively: (i) the greatest reduction of surface tension and the highest pH reduction; (ii) the greatest emulsification activity for EWO; (iii) the highest pH reduction and the greatest emulsification activity for EWO and (iv) the greatest biomass production.

These results show that the yeast *C. lipolytica* UCP 0988 exhibits behavior halo-alkali-tolerant and is capable of use diesel fuel and grow in the seawater hypersaline, acidic or alkaline or highly alkaline supplemented with sources of nitrogen and phosphorus.

The high values of the emulsification activity for EWO, pH reduction, surface tension reduction and biomass production obtained in assays of the  $2^4$  FDD, especially in the assays 4, 5, 14 and 17, could be considered as biological indicators of diesel oil biodegradation in sea water by *C. lipolytica* UCP 0988. These results are consistent with studies published in the literature, that report that the ability of yeasts grow in

mineral medium with hydrocarbons as the only carbon source is a strong indicative of utilization of hydrocarbons by the same (Gomes et al., 2009, Kumari and Abraham, 2011 ; Sood and Lal, 2009).

*Candida lipolytica* UCP 0988 belongs to a non-conventional yeasts group, with respect to physiology, genetics and molecular biology (Barth and Gaillardin, 1997). In the experiments of this work, *C. lipolytica* UCP 0988 shown ability to grow in hypersaline (salinity > 4.7%), acidic (pH 6), alkaline (pH 10) or highly alkaline (pH ≈ 12) seawater contaminated with diesel oil and supplemented with ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic and produce biosurfactants and bioemulsifiers. Despite of the growth in acidic pH, the yeast showed greater ability to grow (higher biomass production) and produce biosurfactants/bioemulsifiers (greater surface tension reduction/emulsification activity) in alkaline and extremely alkaline media. These results confirm previous papers about the ability of the yeast *C. lipolytica* 0988 UCP grow on hydrophobic compounds in diluted natural seawater at concentration of 50% (Gomes, 2009; Vance Harrop et al, 2003, Albuquerque et al, 2006; Henriques et al., 2011), or in non-diluted natural seawater (Souza et al., 2012), adequately supplemented with nitrogen and phosphorus and produce bioemulsifiers and/or biosurfactants with potential of use in biodegradation of contaminated environments by oil and oil products.

Since the typical salinity of seawater is between 3.0 and 3.5% and its pH typically ranges between 7.5 and 8.5 (due to excellent buffering system of the ocean, Henriques et al., 2011, resulting from the interaction between carbon dioxide and seawater), the results obtained in this study suggest that the halo-alkalitolerant yeast *C. lipolytica* UCP 0988 has great potential for application in bioremediation of seawater contaminated by

diesel. Published papers on *Y.lipolytica* strains tolerant to salts confirm the significant role that can be played by this yeast in marine and hypersaline environments (Butinar et al.2005; Kim et al. 2007; Zinjarde et al. 2008).

The results of production of biomass, emulsification activity, surface tension reduction and salt tolerance obtained in this work, using *C.lipolytica* UCP 0988, could be considered very satisfactory, when compared with the results obtained by other diesel oil degrading microorganisms grown in seawater and other media (Huang et al, 2008, Miranda et al, 2007, Murkeji et al, 2004; Pirrôlo et al, 2008) and with the results obtained by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on oil in artificial seawater (Zinjarde, Pant, 2002). The significance of the results increase especially when is considered the short duration (96h) of the biodegradation process and that the *C.lipolytica* UCP 0988 was not acclimated to salt or to diesel oil.

In this study, pure cultures of *C. lipolytica* UCP 0988 grown on diesel oil in seawater supplemented with ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate showed higher tolerance to high salinity than some consortia. The ability of the consortium ES1 to use diesel oil as sole carbon source and tolerate of moderate to high salt concentration in a range of 0-5% salinity was investigated by Murkeji et al, (2004). Acclimated cultures could tolerate salinities above 3.5% NaCl and significant degradation of diesel oil (29%) were observed, although maximal growth and degradation of diesel oil have occurred in salinity of 0.5%, where the extent of diesel oil degradation was significantly higher (61% in 15 days) than in 0% of NaCl. At salt concentrations above 4% and 5%, the diesel losses were comparable to those in the controls (13% and 11%, respectively). In a similar study with a bacterial consortium

developed to use various fractions of crude oil, Kapley et al. (1999) demonstrated that the cultures could tolerate up to 3% NaCl, without any change in growth after 48 h. The authors reported that the culture growth and the utilization of hydrocarbons from crude oil occurred at salinities up to 6% with genetic transformation of organisms using *Pro U operon*, an important osmoregulatory *locus*.

In all assays performed in the current study (Table 2) significant decrease in pH was observed. This result may be related to the formation of organic acids, which may cause a reduction in the measurement of pH in the aqueous phase during the degradation of hydrocarbons (Bento et al, 2005). Besides the formation of organic acids, lowering the pH might be related to cell lysis, polymeric products (Huang, 2008; Miranda et al, 2007, Bucker, 2011) and the formation of other by-products (Rhaman et al, 2003). In bioremediation process, it is necessary that the pH is compatible with the microorganisms. Bacteria thrive with a pH optimum between 5 and 9, whereas fungi which degrade complex compounds have the optimum pH of 5 or less (Sklandany and Metting, 1993). Enzymes are polymers of amino acids and their activities require an appropriate degree of protonation of amino acids. This process is controlled by pH. The optimum pH for the action of microorganisms is usually close to neutrality, but many microorganisms present in aquifers can act without loss of its functions to pH values between 5 and 9 (Corseuil and Alvarez, 1996). In present study, in the assays with initial values of pH equal to 6, 10 and 14, the final values of pH (Table 2) varied respectively within the following ranges: 5.61 and 5.91, 6.94 and 8.90 and 8.09 and 11.16. In the present work, the highest biomass production ( $33.80 \pm 1.68$  g/ L) was obtained with 96h, at pH approximately 8 ( $7.64 \pm 0.92$ ), at the center point of the design.

This result is in agreement with study published by Zinjarde and Pant (2002), in which they report that the best biomass production occurred at pH 8.0, which is the natural pH of seawater (natural habitat of *Y. lipolytica*).

Laboratory simulation of growth of *Pseudomonas aeruginosa* LBI in contaminated water by oil and oil products in diverse concentrations was performed by Piróllo et al (2008). When diesel oil was used as a substrate for growth, the biomass increased in all the experiments, showing the ability of the microorganism to degrade this fuel. The highest production of biosurfactant (9.9 g/L) was obtained using diesel oil at a concentration of 30% (w/v) while the highest biomass production was achieved using diesel oil at a concentration of 20% (w/v). This result was similar to that obtained in this work, in which *C. lipolytica* UCP 0988 showed the highest biosurfactant production (the greatest reduction of surface tension) using diesel oil to 30% (v/v) and the highest biomass production, at the center point of 2<sup>4</sup> FFD using diesel oil to 20%.

Although there are many studies in the literature on biodegradation of oil by various microorganisms in water and soil, there are no much works on biodegradation of petroleum products (such as diesel and kerosene) in seawater by pure cultures and consortia. The number of academic works involving biodegradation of diesel oil by *C. lipolytica* in seawater is narrower still.

A 2<sup>4</sup> full factorial design was carried out during 168 h by Souza et al. (2012), to evaluate - in media with pH adjusted at 5.3 - the effects and interactions of concentrations of diesel oil (1, 3 and 5%), urea, ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic on emulsifying activity and surface tension, in process of diesel oil biodegradation by *C. lipolytica* UCP 0988 in seawater. High emulsification activities

(above 5.4 UAE) were obtained in all assays. The interactions between the organic carbon sources (diesel) and inorganic (urea) and potassium monobasic phosphate favored, with statistical significance, the increase of the emulsification activity of the media. Under the conditions studied, a correlation between the increase of the emulsification activity and the surface tension reduction was not identified. However, it is important to note that the average ( $45,10 \pm 4,75$  mN/m) of the surface tensions, obtained with 96h in the 20 assays (with 10, 20 and 30% diesel oil concentrations) of the present work, was 8.85% lower than the average of the surface tensions obtained with 168h in the 20 assays carried out by Souza et al. (2012).

According to the literature, microorganisms that decrease the surface tension to 40 mN/m or less, are considered good biosurfactant producers (Cooper, 1986, Habba et al., 2000; Mariano et al, 2008). Therefore, when grown on 30% diesel fuel under the conditions of the assay 4 (Table 2) of the present work, during 96 h, the yeast *C.lipolytica* UCP 0988 produced a good biosurfactant, that reduced the surface tension of the medium in 37.06%, lowering the surface tension to 34.13 mN/m.. However, others assays of FFD showed surface tension reduction higher than 25% and final surface tensions above 39 mN/m, suggesting the use of the surface tension reduction greater than or equal to 25% as an indirect indicator to biosurfactant production. The results indicate there is no direct relationship between low surface tension and high emulsification activity or between low surface tension and high biomass production.

Some studies on the production of emulsifiers by *Candida lipolytica* in media containing seawater diluted to 50% - using babassu oil (Vance-Harrop et al, 2003) or

corn oil (Albuquerque et al, 2006) as carbon source - corroborate the results obtained in this work on the influence of potassium monobasic phosphate on the emulsification activity. Such studies also report the dependency of sources of nitrogen and phosphate buffer to produce bioemulsifiers in medium based on seawater.

The effects of changes in levels of environmental factors such as pH and sources of carbon, nitrogen and phosphorus on hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by yeasts in marine ecosystem are still not fully understood. Therefore, the model developed in the present study provide a simple and effective method to simulate the biomass concentration processes diesel oil biodegradation in seawater by *C.lipolytica* UCP 0988 using initial conditions of pH and diesel, ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate concentrations. Other important contribution is the identification of *C.lipolytica* UCP 0988 as yeast with potential to use diesel oil as sole carbon and energy source and grow and produce biosurfactants/bioemulsifiers in the seawater hypersaline and acidic or extremelly alkaline, supplemented with sources of nitrogen and phosphorus.

## 5. Conclusion

Empirical modeling and simulation are essential tools for enhancement and optimization of bioprocesses. The response surface methodology based model developed in the studied conditions in this work, proved to be an effective method to simulate the biomass concentration in diesel oil biodegradation process by *C.lipolytica* UCP 0988 in seawater, using initial values of pH and diesel oil, ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate concentrations. Curvature check

confirmed the proximity of the optimum point and need of implementation of a central composite design, within a sequential optimization strategy. Subsequently, more advance model will be applied to optimize the process..

### **Acknowledgments:**

This study was supported by Pernambuco State Foundation for Science and Technology Support (FACEPE, Grant nº PBPG-1009-3.06/10 ).

### **References**

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1323-1336.
- Albuquerque, C. D .C; Fileti, A. M. F.; Campos-Takaki, G. M., 2006. Optmizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Canadian Journal of Microbiology*, 6, 575-583.
- Banat, I.M., Franzetti, A.,Gandolfi I.; Batestti, G., Martinotti, M.G., Frachia, L., Smith, T.J., Marchant, R. , 2010. Microbial surfactant production, applications and future potential. *Applied Environmental Microbiology* 87, 427-444.
- Barth, G., Gaillardin, C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Review*, 19, 219–237.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke,B.; Frankenberger,W.T., 2005. Comparative bioremediation of soil by natural atenuation, bioestimulation and bioaugmentation. *Bioresource Tecnology*, 96, 1049-1055.
- Bücker, F., Santestevan,N.A., Roesch,L.F. Jacques,R.J.S., Peralba,M.C.R., Camargo,F.A.O., Bento,F.M., 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodet.Biodeg.*, 65, 172-178.
- Butinar, S.S., Spencer-Martins, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N., 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett.*,244,229–234.

Chrzanowski, L., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2006. The ability of *Candida maltosa* for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. Polish Journal of Environmental Studies, 15, 1, 47-51.

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

Cooper, D.G., 1986. Biosurfactants. Microbiol. Sci., 3, 145-149.

Corseuil, H. X., Alvarez, P. J. J., 1996. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. Wat. Sci. Tech., 34, 311-318.

Darvishi, P., Shahab, A., Mowla, D., Niazi, A. (2011) Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84, 292-300.

Das, N., Chandran, P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology Research International, 2011. Article ID: 941810. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/941810>.

Gomes, E.B., Soriano, A.U., Miranda, R.C.M., Sousa, M.F.V.Q, Pereira Jr., N., 2009. Biodegradation of Stored jet Fuel by a *Nocardia* sp. Isolated from Contaminated Soil. Braz. Arch. Biol. Technol. 52, 1279-1284.

Haba, E.; Espuny, M. J.; Busquets, M.; Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. Journal of Applied Microbiology, 88, 379-387

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

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

Horowitz, A.; Gutnick, D. Rosenberg, E., 1975. Sequential Growth of bacterial on Crude Oil. Applied Microbiology 30, 10-19.

Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F-I, Liu, R-L, Li, G-q, 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. Marine Pollution Bulletin 56, 1714-1718.

Ijah, U.J.J., 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Manage*, 18, 293.

Johnsen, A.R., Karlson, U., 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 452-459.

Kaczorek, E., Olszanowski, A. 2011. Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: a cell surface modification. *Water, Air, Soil Pollution* 214, 451-459.

Kapley, A., Purohit, H.J., Chhatre, S., Shanker, R., Chakrabarti, T., Khanna, P., 1999. Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 67, 241-245.

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

Kumari, M., Abraham, J., 2011. Biodegradation of Diesel Oil using yeast. *Research Journal of Environmental Toxicology* 5, 369-377.

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

Márquez-Rocha, F.J.; Hernández-Rodríguez, V.; Lamela, M.T., 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air and Soil Pollution*, 128, 3-4, 313 - 320.

Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. F., Pirôllo, M. P. S., Contiero, J., 2008. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25, 269-274.

Miranda, R. C.; Souza, C.S.; Barros Gomes, E; Lovaglio, R.B.; Carlos Edison Lopes, C.E.; Sousa, M.F.V.Q., 2007. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco -Brazil. *Brazilian archives of Biology and technology*, 50, 147-152.

Mohanty, G.; Mukherji, S., 2008. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 240-250.

Montgomery Douglas C (2005). *Design and Analysis of Experiments Response Surface Method and Designs* (New Jersey, John Wiley and Sons, Inc).

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

Pacwa-Plociniczak, M.; Plaza, G.A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633-654.

Pirôllo, M.P.S., Mariano, A.P., Lovaglio, Costa, R.B S.G.V.A.O.; Walter, V.; Hausmann, R; Contiero, J., 2008. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1484–1490.

Prince, R.C, Gramain, A., McGenity, T.J., 2010. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.M. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1672-1692.

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I. M., 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technol.*, 90, 159-168.

Reisfeld, A., Rosenberg, E., Gutnick, D., 1972. Microbial degradation of crude oil: Factors affecting the dispersion in seawater by mixed and pure culture. *Applied Microbiology* 24, 363-368.

Sklandany, G.J., Metting, 1993. Jr., F.B. Bioremediation of contaminated soil. p. 483 – 513. In: Metting Jr, F.B. (ed.) *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, Inc. New York. 646.

Sood, N., Lal, B., 2009. Isolation of a novel strain yeast *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acid conditions. *J. Environ. Manage.*, 90, 1728-1736.

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

Vance-Harrop, M. H.; Buarque-Gusmão, N.; Campos-Takaki, G. M., 2003. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 120-123.

Xia W, Li J, Xia Y, Song Z, Zhou J., 2012. Optimization of diesel oil biodegradation in seawater using statistical experimental methodology. *Water Sci Technol.*, 66, p.1301-1309.

Xia, W. X.;Li, J. C.;Zheng, X. L.;Bi, X. J.;Shao J. L., 2006. Enhanced Biodegradation of Diesel Oil in Seawater Supplemented with Nutrients.Engineering in life Sciences, 6, 1,80–85.

Zinjarde, S.S., Pant, A.A., 2002. Hydrocarbons degraders from tropical maine environments.Marine Pollution Bulletin 44, 118-121.

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

**Table 1.** Levels and values of the independent variables of the 2<sup>4</sup> full factorial design

Independent Variables	Level		
	-1	0	+1
pH	6	10	14
Diesel (% v/v)	10	20	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	0.10	0.60	1.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0.68	1.36	2.04

**Table 2** – Composition of the biodegradation media and results of the 2<sup>4</sup> full factorial design with 96h

Run	pHi	DO (%v/v)	AS (g/L)	PMP (g/L)	pHf	ΔpH (%)	Sal (‰)	ΔSal (%)	ST (mN/m)	ΔST (%)	EAC (UAE)	Exp. Bio (g/L)	Pred. Bio (g/L)
1	6	10	0.10	0.68	5.66	5.67	55	1.79	48.50	30.45	3.81	11.2	11.46
2	14	10	0.1	0.68	9.82	29.86	55	8.33	44.86	8.56	5.49	8.6	10.06
3	6	30	0.1	0.68	5.61	6.50	60	7.14	54.56	15.19	5.85	7.0	7.21
4	14	30	0.1	0.68	8.84	36.86	56	0.00	34.13	37.06	5.32	14.0	12.06
5	6	10	1.1	0.68	5.75	4.17	55	35.29	46.40	25.71	6.00	13.4	14.76
6	14	10	1.1	0.68	9.14	34.71	50	9.09	44.53	15.12	5.67	14.8	11.71
7	6	30	1.1	0.68	5.91	1.50	56	1.75	45.76	30.98	5.93	10.6	8.762
8	14	30	1.1	0.68	9.42	32.71	56	3.45	44.80	0.22	5.85	8.4	11.96
9	6	10	0.1	2.04	5.74	4.33	61	10.29	46.00	12.88	5.63	9.8	9.71
10	14	10	0.1	2.04	8.02	42.71	65	0.00	38.40	6.57	5.68	16.0	14.36
11	6	30	0.1	2.04	5.72	4.67	67	0.00	52.26	16.86	3.15	15.6	15.21
12	14	30	0.1	2.04	9.20	34.29	62	17.33	48.53	15.83	5.75	24.0	26.11
13	6	10	1.1	2.04	5.80	3.33	58	17.14	49.77	6.68	3.99	15.6	14.06
14	14	10	1.1	2.04	8.84	36.86	65	4.41	46.26	2.53	6.00	13.8	17.06
15	6	30	1.1	2.04	5.90	1.67	58	17.14	45.77	33.31	5.48	15.8	17.81
16	14	30	1.1	2.04	11.16	20.29	47	42.68	44.90	13.45	5.44	30.8	27.06
17	10	20	0.6	1.36	7.75	22.50	58	9.38	45.40	26.42	5.55	33.2	33.80
18	10	20	0.6	1.36	8.90	11.00	57	5.00	42.37	26.78	5.54	32.0	33.80
19	10	20	0.6	1.36	6.95	30.50	57	3.39	39.53	35.89	5.53	34.0	33.80
20	10	20	0.6	1.36	6.94	30.60	57	5.00	39.26	32.19	5.58	36.0	33.80

pHi- initial pH pHf- final pH DO- Diesel Oil AS- Ammonium Sulfate PMP- Potassium Monobasic Phosphate  
 Δ- Variation (reduction) Sal-Salinity ST-SurfaceTension EAC -Emulsification Activity for Water-in- Corn Oil Emulsion  
 Exp.Bio - Experimental Biomass Pred..Bio -I Predicted Biomass

**Table 3** –Identification of the best media for biodegradation of diesel oil in seawater

Assay	pHi	DO (%v/v)	AS (g/L)	PMP (g/L)	pHf	$\Delta$ pH (%)	Sal (‰)	$\Delta$ Sal (%)	ST (mN/m)	$\Delta$ ST (%)	Bio (g/L)	EAC (UAE)
4	14	30	0.1	0.68	8.84	36.86	56	0.00	34.13	37.06	14.0	5.32
5	6	10	1.1	0.68	5.75	4.17	55	35.29	46.40	25.71	13.4	6.00
14	14	10	1.1	2.04	8.84	36.86	65	4.41	46.26	2.53	13.8	6.00
17	10	20	0.6	1.36	7.75	23.65	58	5.69	45.40	26.42	33.2	5.55

pHi- initial pH pHf- final pH DO- Diesel Oil AS- Ammonium Sulfate PMP- Potassium Monobasic Phosphate  $\Delta$ -Variation (reduction) Sal-Salinity ST-Surface Tension Bio-Biomass EAC -Emulsification Activity for Water-in- Corn Oil Emulsion

**Table 4** - Analysis of variance for the experimental results of the 2<sup>4</sup> full factorial design

Source Variation	Sum of squares	Degree freedom	Mean square	F	p
Curvature	1212.125	1	1212.125	428.82	0.000246
Regression	1680.710	11	152.792	15.23	0.000347
Residue	80.272	8	10.034		
Lack of fit	71.793	5	14.359	5.08	0.105708
Pure Error	8.480	3	2.827		
Total	1760.982	19	92.683		
R <sup>2</sup> =0.9544	R <sup>2</sup> adjust=0.8917	F(0.95,11,8)=3.31	F(0.95,5,3)=9.01		

## Figures Caption

**Fig.1** - Best assays of  $2^4$  full factorial design: (a) Center point, replicates 17 to 20 - higher biomass production, (b) Assay 4 - higher reduction of surface tension, (c) Assay 5 - higher emulsification activity at pH 6 and (d) Assay 14 - higher emulsifying activity at pH 14.

**Fig. 2-** Pareto Chart of standardized effects for  $2^4$  full factorial design having as independent variables: (1) pH (2) diesel oil, (3) ammonium sulfate and (4) potassium monobasic phosphate and as response variables with 96h: (a) biomass concentration, (b) surface tension, (c) emulsification activity for water-in-corn oil emulsion (d) and (e) salinity. The point at which the effect estimate is statistically significant ( $p = 0.050$ ) is indicated by the dashed vertical line.

**Fig. 3** - Response surfaces showing biomass concentration with 96h as a function of: (a) pH and diesel oil, (b) pH e ammonium sulfate, (c) pH and potassium monobasic phosphate, (d) ammonium sulfate and potassium monobasic phosphate, (e) diesel oil and ammonium sulfate and (f) diesel oil and potassium monobasic phosphate.

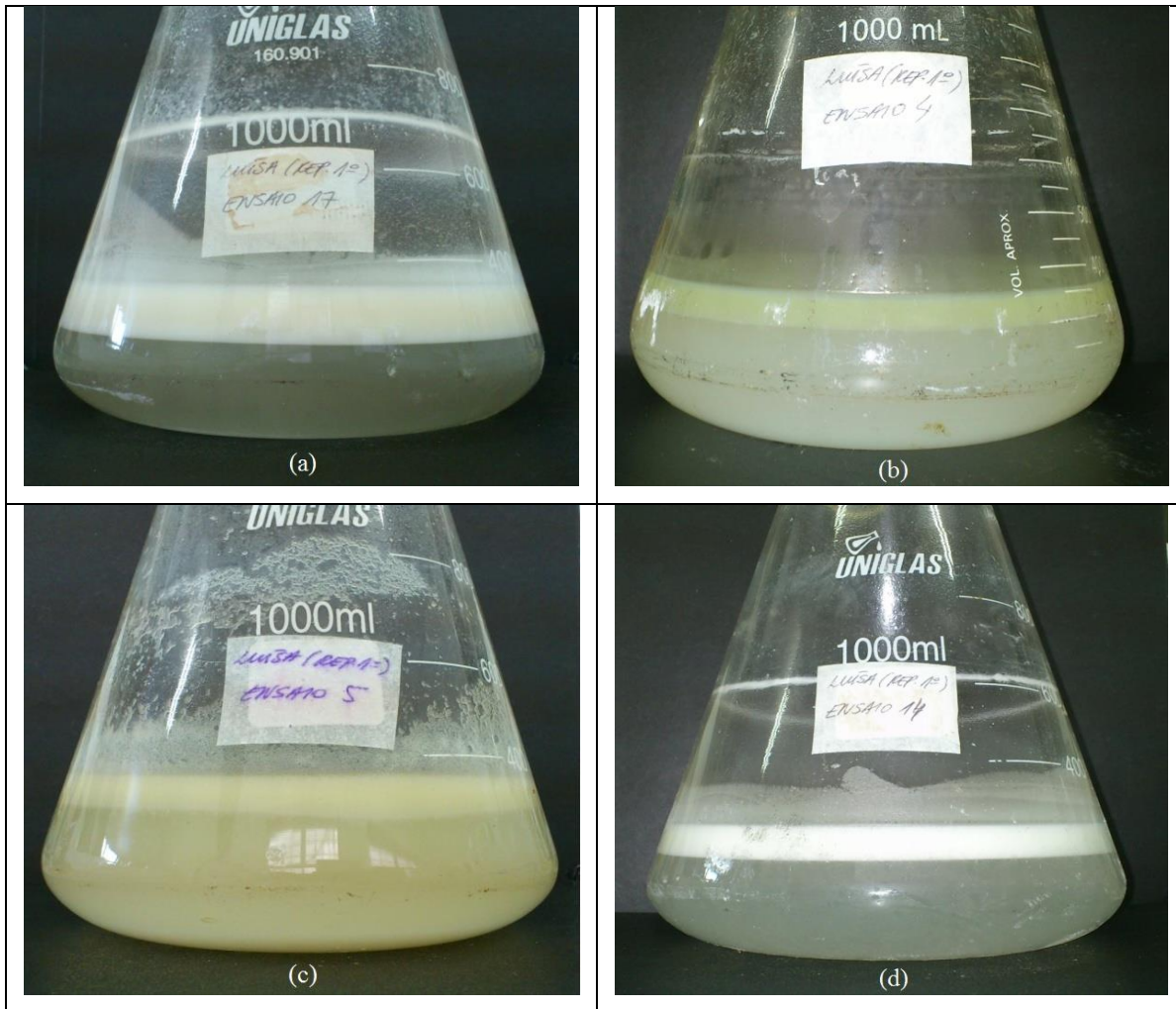


Fig. 1

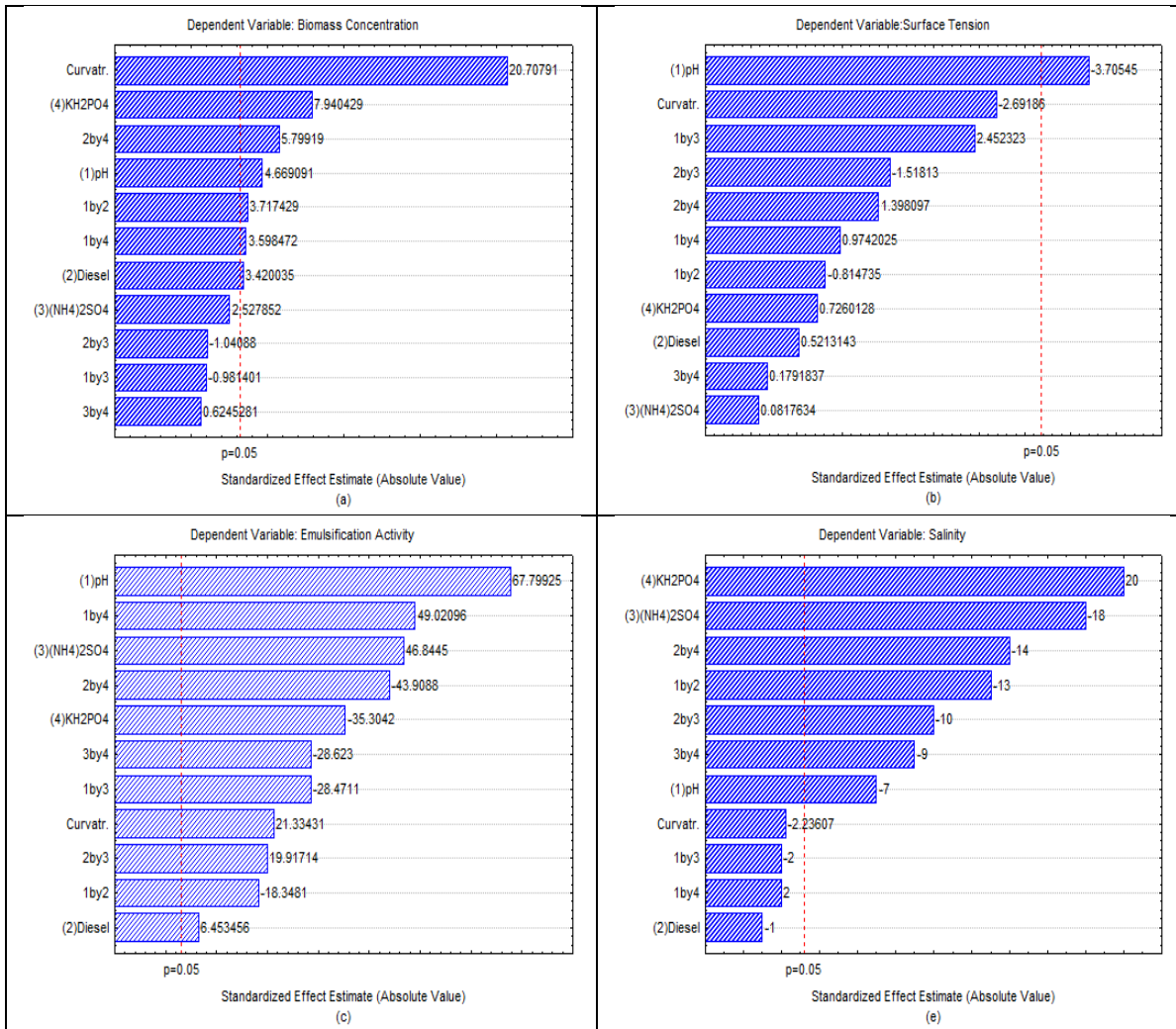


Fig. 2

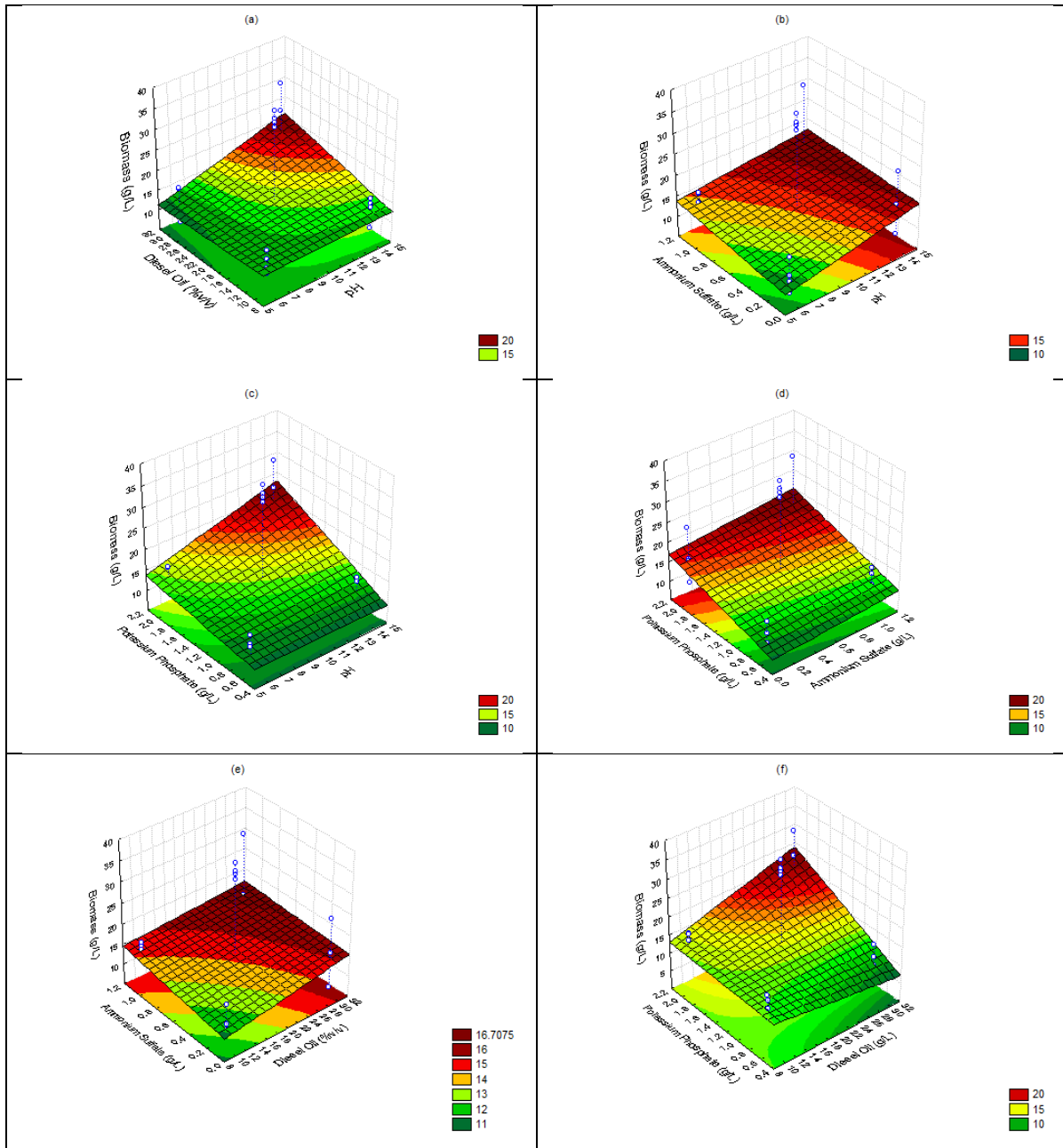


Fig.3

