

ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES E RECUPERAÇÃO DE ÓLEO PESADO EM
MEIOS POROSOS NÃO-CONSOLIDADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P259p
2009

Parreira, Adriano Guimarães, 1974-

Produção de biossurfactantes e recuperação de óleo pesado
em meios porosos não-consolidados / Adriano Guimarães
Parreira. – Viçosa, MG, 2009.

x, 98f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 83-98.

1. Petróleo - Microbiologia. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Agentes
ativos de superfícies. 4. Óleo pesado. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 665.5384

ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES E RECUPERAÇÃO DE ÓLEO PESADO EM MEIOS
POROSOS NÃO-CONSOLIDADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de setembro de 2009.

Prof^a Vera Lúcia dos Santos

Prof^a Célia Alencar de Moraes

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Co-orientador)

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado as forças necessárias para alcançar mais esse objetivo;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia da UFV, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação;

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

A meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo à realização de meu trabalho e pela confiança em mim depositada;

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Antônio Galvão do Nascimento, pelo apoio e ajuda em todos os momentos;

A todos os demais professores, técnicos e servidores do Departamento de Microbiologia da UFV, que contribuíram direta ou indiretamente na execução de meus trabalhos;

A todos os colegas de laboratório, pelo companheirismo e apoio;

A minha mãe Maria Aparecida Guimarães Almeida e aos meus irmãos pelo apoio incondicional;

A minha namorada Viviane Henriques Silva, pela paciência e compreensão, principalmente nos momentos mais delicados e difíceis.

BIOGRAFIA

ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA, filho de Adalberto Parreira Almeida e Maria Aparecida Guimarães Almeida nasceu em Divinópolis-MG no ano de 1974.

Em setembro de 2002, graduou-se em Ciências Biológicas nas modalidades Licenciatura e Bacharelado pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em março de 2005, defendeu dissertação de Mestrado intitulada “Biorremediação de solos Contaminados com Gasolina em Sistemas de Biorreatores”, no Departamento de Microbiologia da UFV.

Naquele mesmo mês ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível Doutorado, em Microbiologia Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa de tese em setembro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Seleção dos isolados produtores de surfactantes.....	27
3.1.1. Microrganismos.....	27
3.2. Ensaio de transporte celular.....	32
3.2.1. Condições de cultivo e obtenção dos inóculos.....	32
3.2.2. Transporte dos isolados selecionados em meios porosos não-consolidados.....	33
3.3. Detecção, avaliação da natureza e quantificação de biossurfactantes recuperados dos meios porosos.....	37
3.4. Detecção de produtos de fermentação nos efluentes de colunas inoculadas.....	38
3.5. Produção de surfactina no interior dos meios porosos.....	39
3.5.1. Avaliação da presença de surfactina em efluentes recuperados dos meios porosos inoculados.....	39
3.5.2. Quantificação da surfactina recuperada.....	40
3.5.3. Tensões interfaciais n-hexadecano/extratos de surfactantes recuperados dos meios porosos.....	40
3.5.4. Avaliação do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) dos surfactantes recuperados das colunas.....	41
3.6. Recuperação do óleo pesado dos meios porosos inoculados com as culturas mistas dos	

isolados selecionados.....	42
3.7. Avaliação da colonização microbiana no interior de meios porosos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
3.8. Composição do petróleo recuperado das colunas inoculadas com as culturas dos isolados selecionados.....	46
4. Resultados e discussão.....	47
4.1. Seleção e identificação dos isolados produtores de surfactantes.....	47
4.2. Eficiência de transporte dos isolados de <i>B. subtilis</i> LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 nos meios porosos não-consolidados.....	50
4.3. Detecção e avaliação da natureza dos surfactantes recuperados dos sistemas porosos.....	58
4.4. Quantificação da surfactina recuperada de colunas inoculadas com os isolados de <i>B. subtilis</i> selecionados.....	60
4.5. Produção de ácidos orgânicos e de 2,3 butanodiol pelos isolados de <i>Bacillus</i> inoculados nos sistemas porosos.....	62
4.6. Tensão interfacial n-hexadecano/extratos de surfactantes de efluentes das colunas inoculadas com os isolados de <i>B. subtilis</i>	65
4.7. Índice de emulsificação inicial (EI) e estabilidade das emulsões (E24) dos surfactantes recuperados de colunas inoculadas com os isolados selecionados.....	66
4.8. Diluição micelar crítica (DMC) de extratos de surfactantes obtidos de efluentes das colunas inoculadas com os isolados selecionados.....	68
4.9. Avaliação da toxicidade de extratos de surfactantes recuperados de culturas mistas dos isolados de <i>Bacillus</i> selecionados.....	71

4.10. Avaliação da recuperação de óleo pesado das colunas inoculadas com os isolados de <i>B. subtilis</i>	72
4.11. Avaliação da colonização microbiana no interior dos meios porosos saturados com o óleo pesado.....	77
4.12. Avaliação qualitativa dos hidrocarbonetos constituintes do óleo pesado recuperado da coluna inoculada com a cultura mista dos isolados selecionados.....	79
5. CONCLUSÕES.....	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO

PARREIRA, Adriano Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Produção de biossurfactantes e recuperação de óleo pesado em meios porosos não-consolidados**. Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Antônio Galvão do Nascimento.

Estima-se que as reservas mundiais de petróleo pesado, caracterizado por elevadas densidade e viscosidade, superem em mais da metade as reservas mundiais de óleo leve. As características inerentes ao óleo pesado tornam seu processo de extração difícil e oneroso, o que gera a necessidade de se desenvolver novas técnicas que viabilizem sua recuperação. Nesse contexto, a aplicação de processos de MEOR revela-se como uma estratégia factível e promissora. O presente estudo teve como principais objetivos selecionar isolados de *Bacillus* que produzem surfactantes nas condições encontradas nas jazidas de petróleo capazes de promover a recuperação de óleo pesado de meios porosos inoculados com os mesmos. Foram encontrados dois isolados, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 4914 e *B. subtilis* LBBMA 4951, com características desejáveis para aplicação em MEOR. Demonstrou-se que os isolados de *Bacillus* selecionados são capazes de produzir surfactantes quando cultivados em anaerobiose, a 34 °C e em meio mineral E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v). Comprovou-se ainda que os isolados selecionados apresentam elevada eficiência de transporte (70 %) e produzem surfactina a 26,5 mg L⁻¹ quando injetados na forma de endósporos e em culturas mistas em meios porosos não-consolidados. Surfactantes produzidos pelos isolados em cultura mista no interior dos meios porosos apresentaram valores de DMC próximos de 8, valores de tensões superficiais próximos de 29,5 mN m⁻¹, e tensões interfaciais contra *n*-hexadecano a 2,5 mN m⁻¹. A injeção dos isolados em cultura mista e na forma de endósporos, suspensos em meio mineral E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v), possibilitou a recuperação de 12,9 % do petróleo pesado contido nas colunas empacotadas com areia. A utilização de água de produção como inóculo levou à recuperação de 10,3 % do total de óleo injetado, superando os resultados obtidos com a inoculação dos dois isolados selecionados injetados na forma de culturas puras. Alterações na composição de hidrocarbonetos constituintes de amostras de óleo pesado, recuperadas de coluna submetida ao tratamento com a cultura mista, indicam a possível ocorrência de

biotransformações estimuladas pelos isolados de *B. subtilis* selecionados. A capacidade de produção de surfactantes no interior de meios porosos não-consolidados e a recuperação de óleo pesado dos mesmos credenciam os isolados de *B. subtilis* selecionados nesse estudo como potencialmente aplicáveis em estratégias *in-situ* de recuperação avançada de petróleo, sobretudo nas condições que melhor favoreceram a produção de surfactantes por aqueles isolados.

ABSTRACT

PARREIRA, Adriano Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Biosurfactant production and recovery of heavy oil in porous media unconsolidated**. Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisors: Arnaldo Chaer Borges and Antônio Galvão do Nascimento.

The world reserves of heavy oil, characterized by high density and viscosity, are estimated to be more than 50% larger than those of light oil, hence the need to develop new techniques for their recovery. These characteristics highlight the need to develop new techniques that allow for their recovery. In this context the application of Microbial Enhanced Oil Recovery process is revealed as a feasible and promising strategy. This study aimed to select isolates of *Bacillus* able to produce surfactants in the conditions of the oil reserves and to recovery heavy oil of unconsolidated porous media inoculated with them. We isolated *B. subtilis* subspecie *spizizenii*, LBBMA 4914 and *B. subtilis* LBBMA 4951, with desirable characteristics for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. These isolates are able to produce surfactants when cultivated under anaerobic conditions, in 34 °C and mineral medium containing glucose to 2.0% (w/v) and NaCl to 5.0% (w/v). Isolates LBBMA 4914 and LBBMA 4951 in the form of endospores and mixed cultures have high transport efficiency of its cells in sand packed columns 70% and capacity of surfactin production inside the porous media to 26.3 mg L⁻¹. The mixed cultures inoculated in porous media produced surfactants with DMC values of 8, reduced the surface tension to 29.4 mN m⁻¹ and reduced interfacial tensions on n-hexadecane to 2.5 mN m⁻¹. The injection of the strains in mixed cultures and suspended in mineral medium containing 2.0% (w/v) glucose and 5.0% (w/v) NaCl provided 12.9% of heavy oil recovery of unconsolidated porous media. The injection of production water how inoculate enabled the recovery of 10.3% of heavy oil, that surpassed those obtained with the injection of LBBMA 4914 and LBBMA 4951 in the form of pure cultures. There were changes in the hydrocarbon composition of oil samples recovered from columns subjected to treatment with a mixed culture, indicating possible biotransformation of the heavy oil by the selected strains of *B. subtilis*. The ability of *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 4914 and *B. subtilis* LBBMA 4951 to produce surfactants and promote the heavy oil recovery from porous media qualify them to apply in strategies of enhanced oil recovery *in-situ*, however, conditions that favor their production of surfactant need to be addressed.

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de energia é um dos fatores determinantes da estabilidade social e da viabilidade econômica de uma nação. Atualmente, o petróleo é uma fonte de energia indispensável e um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento econômico mundial (Hall *et al.*, 2003). O crescente consumo e a limitação de suas reservas têm estimulado as companhias petrolíferas a incrementarem seus investimentos em projetos que visam aumentar a produtividade em seus reservatórios, sobretudo naqueles já maduros, nos quais são empregados processos de recuperação avançada de petróleo (EOR) (Curbelo *et al.*, 2007). Dentre as estratégias de EOR conhecidas, destacam-se aquelas que utilizam microrganismos ou seus metabólitos, as estratégias de recuperação de petróleo melhorada microbiologicamente (MEOR). Podem ser adotados processos de MEOR “*in-situ*” ou “*ex-situ*”, os quais relacionam-se aos múltiplos efeitos dos microrganismos ou dos metabólitos por eles produzidos sobre o reservatório ou sobre o óleo nele presente (Ollivier e Magot, 2005).

O fator que determina a viabilidade de aplicação de determinadas técnicas de recuperação, por sua vez, está intimamente ligado à quantidade e ao tipo de petróleo encontrado, podendo esse ser classificado como leve, médio ou pesado. Estima-se que mais da metade das reservas de petróleo espalhadas pelo mundo sejam constituídas por óleos com viscosidades variando entre 100 a 1000 cP e densidades entre 10° a 20 °API, ou seja, a presença de óleos pesados ao redor do mundo supera a presença de óleos leves já provados (Banwart e Trevisan, 2006). Dadas as características de densidade e de viscosidade do óleo pesado, sua recuperação representa um desafio na busca por novas tecnologias

que viabilizem seu amplo aproveitamento. No Brasil, a descoberta de óleos pesados tem sido freqüente, o que tem gerado maior demanda por investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias de produção (Shecaira, *et al.* 2002). Os principais fatores a serem considerados na exploração de reservatórios de óleo pesado são o alto custo e as dificuldades técnicas nas etapas de extração. Forças capilares existentes entre o óleo e a rocha contribuem significativamente para a redução de sua mobilidade, estando a recuperação do petróleo diretamente dependente da redução de tais forças (Ollivier e Magot, 2005). Agentes com atividade tensoativa, ou surfactantes, possuem a capacidade de reduzir a tensão nas interfaces água-óleo e óleo-rocha, o que leva à redução das forças capilares culminando com incrementos na recuperação do petróleo (Banat *et. al.*, 2000).

O emprego de biossurfactantes, surfactantes de origem microbiana, mostra-se uma estratégia de EOR bastante promissora, ambientalmente correta e menos onerosa, que propicia aumentos importantes na recuperação de óleo, comprovados tanto em experimentos de bancada (Maugdalya *et. al.*, 2004; Okpokwasili e Ibiene, 2006) quanto em experimentos de campo (Li *et. al.*, 2002). Os biossurfactantes são produzidos por inúmeras espécies microbianas apresentando grande diversidade estrutural e funcional (Ron e Rosenberg, 2001). Em geral, diversas espécies de *Bacillus* são comumente encontradas nos reservatórios de petróleo e grande parte delas apresenta alta capacidade de produção de surfactantes, principalmente aqueles caracterizados pela presença de uma porção lipídica e outra protéica na molécula, os chamados lipopeptídeos (McInerney *et al.*, 2003). Dentre os lipopeptídeos destaca-se a surfactina, um dos surfactantes mais efetivos e estudados, produzidos por isolados de *Bacillus subtilis* (Arima *et al.*, 1968).

Além de produzirem surfactantes nas condições encontradas nas jazidas, isolados de *B. subtilis* são ainda capazes de produzir endósporos, dotados de importantes características para aplicação em pesquisas de MEOR. Bactérias do gênero *Bacillus* podem ainda metabolizar hidrocarbonetos que constituem o óleo pesado, sejam suas frações mais leves ou as de maior massa molecular, sendo a quebra das frações mais pesadas efeito desejável que acabaria por aumentar a mobilidade do óleo nos

reservatórios (Magot *et al.*, 2000). A formação de endósporos e a habilidade dos isolados de *B. subtilis* em produzirem surfactantes nas condições encontradas nas jazidas os credenciam como os mais indicados para aplicação em processos de MEOR. Linhagens autóctones encontradas nos reservatórios, no entanto, podem não ser capazes de produzir surfactantes ou produzi-los em quantidades pouco significativas para a mobilização do óleo. A injeção de isolados, caracterizados como bons produtores de surfactantes, ou a injeção de surfactantes produzidos *ex-situ* torna-se, portanto, inevitável nesses casos (McInerney *et al.*, 2004).

O estudo do transporte de bactérias em meios porosos constitui, por outro lado, etapa preliminar e fundamental para a implementação de estratégias de MEOR, principalmente as estratégias baseadas na produção *in-situ* de surfactantes. Inúmeros obstáculos ao efetivo transporte de bactérias em sistemas porosos, a exemplo de entupimentos diversos provocados por agregações celulares assim como interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as células e as partículas constituintes do sistema, podem interromper o fluxo celular ao longo do meio poroso inviabilizando assim a efetivação do processo de recuperação desejado (Sarkar *et al.*, 1994).

Com base nessas considerações, no presente trabalho foram testadas as hipóteses de que isolados de *Bacillus*, originários de amostras de óleo e de água de produção de poços produtores de óleo pesado, produzem surfactantes nas condições encontradas nas jazidas, são transportáveis em meios porosos não-consolidados, produzem surfactantes no interior dos mesmos em condição de saturação com óleo pesado possibilitando assim a recuperação do óleo pela ação dos surfactantes por eles produzidos. Para alcançar esses objetivos foram conduzidos experimentos de triagem de produtores de surfactantes nas condições encontradas nas jazidas, foi testada a eficiência de transporte dos isolados selecionados na forma de células vegetativas e de endósporos em culturas puras e mistas ao longo de meios porosos não-consolidados; foi avaliada a redução das tensões superficiais e interfaciais promovida pelos surfactantes recuperados das colunas inoculadas; foi avaliada a ocorrência de alterações qualitativas em amostras de óleo recuperadas de colunas inoculadas com culturas mistas dos isolados selecionados, foi verificada a

colonização microbiana no interior dos sistemas porosos por meio de microscopia eletrônica de varredura e ainda determinada a recuperação de óleo pesado em colunas submetidas a diferentes tratamentos de inoculação dos isolados de *B. subtilis* selecionados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A retirada do petróleo da formação rochosa (reservatório) é denominada recuperação de petróleo. O petróleo é inicialmente retirado ou, naturalmente recuperado, como o resultado das diferenças de pressão entre o meio interno e externo ao reservatório, sendo esse estágio referido como recuperação primária do petróleo (Berger e Anderson, 1992). A pressão ou energia natural de um reservatório é suficientemente grande para que, no momento da abertura de um poço, o óleo e o gás fluam livremente para a superfície. A pressão é reduzida ao longo do tempo e, quando não há mais produção, dá-se início à etapa de recuperação secundária, caracterizada pela injeção de fluidos, essencialmente água ou gases, muitas vezes provenientes da própria jazida (Ollivier e Magot, 2005).

A injeção de gases imiscíveis ou água é executada com dois objetivos principais: manter a pressão interna do reservatório e direcionar o óleo aos poços produtores. No entanto, nem todo o petróleo originalmente presente em determinado campo é arrastado pelo fluido injetado (Ollivier e Magot, 2005). Após as etapas de recuperação primária e secundária, estima-se um fator de recuperação médio variando entre 30 a 40 %, relativo ao petróleo originalmente presente na jazida ou petróleo original *in place* (OOIP). Em muitos reservatórios contendo petróleo classificado como pesado, no entanto, as etapas de recuperação primária e secundária são ainda menos eficientes, promovendo recuperações que variam entre 5 a 20 % do petróleo originalmente presente naqueles reservatórios (Dong *et al.*, 2009). A porcentagem exata de recuperação, no entanto, dependerá da natureza do petróleo, das características do reservatório e do número e posições dos poços produtores (Donaldson *et al.*, 1985).

O uso de tecnologias mais sofisticadas, empregadas em mecanismos de recuperação avançada de petróleo (EOR), visa à recuperação do óleo que ainda permanece no reservatório, o que corresponde

em muitos casos a aproximadamente 70 % de seu volume inicial (Curbelo *et al.*, 2007). As estratégias de EOR são baseadas em métodos térmicos, químicos, de miscibilidade ou microbiológicos (Ollivier e agot, 2005). As diferentes metodologias visam, por sua vez, a aplicação de mecanismos que satisfaçam um objetivo em comum: promover a mobilização e o incrementando da recuperação de óleo das jazidas. Os métodos térmicos são os mais empregados atualmente, a exemplo dos processos de injeção de fluidos aquecidos ou de vapores, capazes de reduzir a viscosidade do óleo facilitando assim seu fluxo ao longo do meio poroso. A combustão *in-situ* é outra estratégia que compartilha do mesmo princípio, já que a combustão do óleo no próprio reservatório, estimulada pela injeção de ar, promove aumentos em sua temperatura e conseqüentemente a redução de sua viscosidade (Donaldson *et al.*, 1990).

Os métodos químicos baseiam-se na injeção de solventes, polímeros ou surfactantes. A injeção de solventes possibilita a formação de um banco miscível com viscosidade mais próxima a da água, o que reduziria o contraste de mobilidades permitindo assim maior eficiência de varrido. A injeção de polímeros aumenta a viscosidade da água, propiciando um varrido mais uniforme e conseqüentemente aumentos na eficiência de recuperação. A injeção de surfactantes reduz a atuação das forças capilares pela redução das tensões interfaciais óleo-água e óleo-rocha, promovendo a mobilização do óleo aprisionado nos poros da rocha e sua conseqüente recuperação. A injeção de gases miscíveis, a exemplo de dióxido de carbono, metano e etano, caracterizando as técnicas de variação de miscibilidade, também atua no sentido de reduzir a viscosidade do óleo facilitando sua mobilização a partir da rocha reservatório (Abram, 2000; Donaldson *et al.*, 1990).

Embora promissora, a recuperação de petróleo promovida pela adoção de metodologias de EOR representa menos de 10 % do total de petróleo extraído nos Estados Unidos, devido, sobretudo, a complexidades técnicas, heterogeneidade dos reservatórios e aos altos custos operacionais (Ollivier e Magot, 2005). Nesse contexto, os mecanismos microbiológicos de recuperação de petróleo apresentam-se como uma alternativa viável, já que não demandam os elevados investimentos em energia requeridos

pelos processos térmicos, além de não dependerem do preço do óleo cru, a exemplo de métodos baseados na injeção de surfactantes sintéticos (Lazar *et al.*, 2007).

Nos processos de recuperação de petróleo melhorada microbiologicamente, designados coletivamente como MEOR, a atividade microbiana é explorada com vistas a aumentar a recuperação de petróleo dos reservatórios. A injeção de nutrientes, caracterizando estratégias de bioestimulação, ou a injeção de microrganismos, em estratégias de bioaumentação, são alternativas que visam promover o crescimento microbiano *in-situ* e/ou produção de metabólitos úteis à MEOR, culminando com incrementos na mobilização do petróleo aprisionado nos reservatórios. Alternativamente, produtos microbianos efetivos na mobilização do óleo podem ser produzidos por processos fermentativos *ex-situ* e posteriormente injetados no reservatório. A adoção de estratégias *ex-situ*, no entanto, depende da proximidade do local de produção com os locais de sua aplicação, demanda gastos energéticos consideráveis durante a etapa de injeção dos produtos microbianos além de depender de processos fermentativos de alto rendimento (Van Hamme *et al.*, 2003).

Somente bactérias são consideradas candidatos em potencial para aplicação em processos de MEOR. Os demais microrganismos, a exemplo de algas, protozoários e leveduras são inadequados, dado seu tamanho ou incapacidade de crescerem sob as condições encontradas nos reservatórios (Van Hamme *et al.*, 2003). Registros do uso de microrganismos ou de metabólitos microbianos em processos de recuperação de petróleo datam de 1926. Nessa ocasião, Bekman, ao estudar a possível ação de bactérias sobre óleo mineral, concluiu que enzimas bacterianas poderiam ser úteis na recuperação de petróleo, cuja viscosidade elevada seria o fator responsável pelo impedimento de seu fluxo ao longo da jazida e o declínio de sua produção. Em 1946 uma patente foi registrada por Zobell, que descrevia os resultados obtidos em seus trabalhos com bactérias redutoras de sulfato, capazes de promover alterações físico-químicas nos reservatórios de petróleo que promoviam incrementos na recuperação do óleo. Em 1960, outras espécies bacterianas foram testadas por Hitzmann, que propunha o uso de esporos e de células vegetativas de bactérias tanto aeróbias quanto anaeróbias para aplicações em MEOR. Levantava

ainda a hipótese de que o próprio petróleo das jazidas serviria como a fonte de carbono e energia para os microrganismos injetados. A injeção de oxigênio para suprir as bactérias aeróbias, no entanto, foi sujeita a questionamentos do ponto de vista prático, chegando-se ao consenso de que a utilização de microrganismos anaeróbios seria a alternativa mais viável para a aplicação em processos de MEOR *in-situ* (Jenneman, 1989). Moses *et al.* (1983) concluíram, por sua vez, que o crescimento anaeróbio, a partir do uso de petróleo como única fonte de carbono e energia poderia ocorrer, entretanto, de forma tão lenta e gradual que inviabilizaria a estratégia de recuperação proposta. Já em meados da década de 1960, não havia mais interesse no desenvolvimento de pesquisas no campo da microbiologia do petróleo, em virtude, sobretudo, da queda vertiginosa no preço do barril que não justificava investimentos significativos em estudos ou aplicação dos processos de recuperação terciária disponíveis até aquele momento. Posteriormente, o aumento dos preços do barril de petróleo e o reconhecimento de que havia mais petróleo residual em campos maduros do que naqueles a serem descobertos, acabou por despertar renovado interesse na aplicação de microrganismos em processos de recuperação avançada de petróleo (Jenneman, 1989).

A aplicação das metodologias de MEOR tem avançado de estudos em escala de bancada, típicos do início dos anos 1980, para estudos de aplicações em campo, a partir da década de 1990 (Singh *et al.*, 2007). Inúmeras estratégias de MEOR vêm sendo adotadas em diferentes países, a exemplo de seu emprego em campos de petróleo da Argentina (Buciak *et al.*, 1995; Strappa *et al.*, 2004 apud Marshall, 2008), da China (Zhang *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002; Nagase *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2002 apud Marshall, 2008), da Indonésia (Sugihardjo *et al.*, 1999; Kadarwati *et al.*, 2001; Sabut *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2004 apud Marshall, 2008), do Irã (Abtahi *et al.*, 2003 apud Marshall, 2008), e dos Estados Unidos (Vadie *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998 apud Marshall, 2008). É difícil, entretanto, estabelecer conclusões gerais acerca dos resultados obtidos nos países citados acima, dada a grande heterogeneidade mineralógica e físico-química dos diferentes reservatórios (Marshall, 2008). Ainda assim, muitos resultados são promissores, a exemplo dos trabalhos desenvolvidos por Dietrich *et al.* (1996) que

descreveram diversos casos de sucesso na aplicação de MEOR, obtendo incrementos na produção de petróleo variando de 10 a 500 %. Youssef *et al.* (2007) detectaram, por sua vez, a produção de surfactantes, por culturas mistas de isolados de *Bacillus subtilis* injetados em poços de petróleo, em quantidades que superaram em até nove vezes a concentração mínima requerida para mobilizar petróleo em núcleos de arenito tipo Berea. Os processos de MEOR têm despertado o interesse de muitos pesquisadores por se tratar de uma estratégia de grande viabilidade econômica, já que os produtos microbianos ou as próprias células podem ser obtidos a partir de substratos renováveis e de baixo custo, a exemplo de melão, manífera e outros (Cameotra & Makkar, 1998; Nitschke *et al.*, 2004; 2006; Barros *et al.*, 2007b; Barros *et al.*, 2007c; Rossmann, 2008). Alguns trabalhos descrevem que processos de MEOR têm apresentado excelente relação custo/benefício, com ganhos na produção de petróleo a partir de investimentos de 3 dólares por barril (Youssef *et al.*, 2007).

As tecnologias de MEOR baseiam-se, de forma geral, nos múltiplos efeitos provocados pelos microrganismos ou pelos metabólitos por eles produzidos sobre o ambiente reservatório ou sobre o petróleo nele contido. Esses efeitos podem atuar de maneira sinérgica e incluem, dentre outros: a formação de gases, a exemplo de CO₂ e CH₄, capazes de promover aumentos da pressão interna e assim a redução da viscosidade do óleo; a produção de ácidos (acetato, lactato e butirato, principalmente), capazes de degradar a matriz calcária de jazidas com aquele tipo de formação; produção de solventes (etanol, butanol e acetona, por exemplo) que também atuam na redução da viscosidade do óleo; biodegradação de macromoléculas constituintes do petróleo, o que promoveria, igualmente, a redução de sua viscosidade; produção de polímeros, a exemplo de polissacarídeos e proteínas, capazes de aumentar a viscosidade da água de injeção; produção de bioemulsificantes tais como heteropolissacarídeos e proteínas, atuantes em processos de emulsificação do óleo; produção de surfactantes (glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, dentre outros), efetivos na redução de tensões interfaciais água-óleo ou óleo-rocha ou, ainda, bloqueios seletivos pela presença de biomassa em zonas de alta permeabilidade (Jack, 1988; McInerney *et al.*, 2005). Dentre as possibilidades listadas, a estratégia do uso de surfactantes

nos processos de MEOR tem recebido atenção especial, em virtude das inúmeras e importantes propriedades que lhe são peculiares, dentre elas, a capacidade de aumentar a pseudo-solubilidade de hidrocarbonetos em água (Chu, 2003; Pekdemir *et al.*, 2005 em Singh *et al.*, 2007), são efetivos na redução das tensões interfaciais *in-situ* e ainda são capazes de reduzir a viscosidade do óleo e promover a remoção da água misturada ao petróleo, denominada quebra de emulsões, em etapas que precedem seu processamento (Al-Sabagh, 2000; Liu *et al.*, 2004 em Singh *et al.*, 2007).

Surfactantes de origem microbiana e com alta capacidade emulsificante são denominados biossurfactantes. Assim como os surfactantes sintéticos são moléculas anfipáticas constituídas por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, o que permite sua distribuição em interfaces com diferentes graus de polaridade (Nitschke e Pastore, 2002). Seus grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos respondem por suas propriedades de adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro-emulsões, lubrificação, ação espumante, capacidade molhante, solubilização e detergência (Christofi & Ivshina, 2002).

Os biossurfactantes são estruturalmente e funcionalmente bastante diversificados, sendo classificados como glicolipídios, fosfolipídios, lipídios neutros, ácidos graxos, lipopolissacarídeos, lipopeptídios, lipoproteínas, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Tabela 1), sendo os lipopeptídeos os mais efetivos (Desai & Banat, 1997). Podem apresentar carga em seu grupamento hidrofílico sendo também classificados como catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (anfotéricos) (Christofi & Ivshina, 2002). Propriedades características dos surfactantes como tensão superficial e interfacial, capacidade de estabilização de emulsões e balanço lipofílico-hidrofílico (HLB) são adotadas para sua qualificação em termos de atividade (Maneerat, 2005). Sua capacidade de formar emulsões e de solubilizar compostos hidrofóbicos pode ser útil na biodisponibilização de compostos orgânicos em processos de biorremediação (Muthusamy *et al.*, 2008; Nitschke & Pastore, 2002). Apresentam ainda a propriedade de aumentarem a estabilidade de emulsões, já que reduzem a tensão interfacial, diminuindo assim a energia na superfície entre duas fases (Bezerra, 2006; Mulligan, 2005).

Tabela 1. Classificação dos surfactantes e seus microrganismos produtores

Classe	Biossurfactante	Microrganismo	Referência
Baixo	Glicolipídeos:		
Peso	Ramnilipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BENINCASA et al. (2004)
Molecular	Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apícola</i>	HOMMEL et al. (1994)
	Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	UCHIDA et al. (1989)
	Flavolipídeos:	<i>Flavobacterium</i> sp MTN11	BODOUR et al. (2004)
	Lipopeptídeos e lipoproteínas:		
	Lipopeptídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>	YAKIMOV et al. (1998)
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NEU et al. (1990)
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	CARILLO et al. (2003)
	Gramicidina S	<i>Bacillus brevis</i>	AZUMA & DEMAIN (1996)
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>	FALAGAS et al. (2005)
	Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos:		
	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter parafineus</i>	MAKKAR & CAMEOTRA (2002)
	Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>	MAKKAR & CAMEOTRA (2002)
	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	LEMKE et al. (1995)
Alto	Surfactantes poliméricos:		
Peso	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ROSENBERG et al. (1993)
Molecular	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ROSENBERG et al. (1988)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	CIRIGLIANO & CARMAN (1984)
	Manoproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAMERON et al. (1988)
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	NAVON-VENEZIA et al. (1995)

Fonte: Desai e Banat (1997)

Os biossurfactantes exibem a capacidade de formar micelas a partir de determinada concentração no meio onde se encontram, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), peculiar a cada um deles. A causa da formação de micelas, a partir da associação de monômeros de surfactantes, relaciona-se à tendência de redução da área de contato entre as caudas hidrofóbicas do surfactante e a água, ou entre as cabeças hidrofílicas e a fase oleosa. Adicionando-se surfactantes a interfaces água/ar ou óleo/água ocorre a redução da tensão interfacial até se atingir determinado valor. A partir desse momento, as moléculas dos surfactantes iniciam um processo de organização em formas supramoleculares, a exemplo das micelas, e essas, ao contrário dos monômeros, dispersam-se em solução não ocorrendo mais alterações na tensão superficial. Dessa forma, a CMC pode ser definida como a concentração máxima em que se observam monômeros de moléculas do surfactante em solução (Bezerra, 2006; Mulligan, 2005).

A atividade de alguns biossurfactantes permanece estável em condições físico-químicas variadas e adversas, a exemplo de condições extremas de temperatura, salinidade, pressão e de pH. Estudos comprovam que vários tipos de biossurfactantes são tolerantes à autoclavagem (121 °C/20 min), toleram armazenamento à temperatura de 18 °C por até 6 meses e em concentrações de NaCl que superam 20 % (p/v). É reportado ainda que a tensoatividade de alguns biossurfactantes não se altera na faixa de pH variando entre 5 a 11 (Nitschke & Pastore, 2006; Bognolo, 1999).

No que se refere à recuperação de petróleo, a baixa eficiência nas etapas primária e secundária é creditada basicamente a dois fatores principais: alta viscosidade do óleo no reservatório e elevadas tensões interfaciais entre o fluido injetado e o óleo retido nos poros da rocha. Quando a viscosidade do fluido injetado é muito menor que a do fluido a ser deslocado, o primeiro se move muito mais facilmente no meio poroso, encontrando caminhos preferenciais e se dirigindo rapidamente aos poços de produção. O óleo fica retido porque o fluido injetado não se propaga adequadamente no reservatório, permanecendo grandes extensões da rocha em que o deslocamento não se processou. No caso de altas tensões interfaciais, a capacidade do fluido injetado de desalojar o óleo do reservatório é bastante reduzida,

deixando elevadas saturações residuais de petróleo nas regiões já contatadas pelo fluido de injeção (Thomas, 2001). Os surfactantes são eficazes na recuperação de óleo pela redução das referidas tensões interfaciais, levando a uma maior mobilização e maior recuperação do petróleo. A explicação para tal fenômeno pode ser dada por uma grandeza física denominada número capilar, definida pela equação abaixo (McInerney *et al.*, 2005):

$$N_{ca} = \mu v / \gamma$$

Onde:

μ = viscosidade da fase aquosa

v = velocidade do fluido

γ = tensão interfacial óleo/água

Pela equação apresentada, a redução da tensão interfacial óleo/água promove incrementos nos valores do N_{ca} e, dessa forma, incrementos na produção final de petróleo (McInerney *et al.*, 2005). Os biossurfactantes, como são capazes de reduzir as tensões nas interfaces água-óleo e óleo-rocha, acabam por diminuir as forças capilares que previnem a mobilização do óleo (Banat *et al.*, 2000). Isso é possível graças a seu acúmulo em interfaces de fluidos imiscíveis, aumentando a solubilidade e a mobilidade de compostos orgânicos insolúveis ou hidrofóbicos (Prince, 1997; Ron e Rosenberg, 2002; Mulligan, 2005 apud Singh *et al.*, 2007).

O emprego de biossurfactantes em processos de MEOR pode envolver três estratégias: injeção de microrganismos produtores nos reservatórios e subsequente estímulo à sua multiplicação e produção de moléculas tensoativas “*in-situ*”; injeção de nutrientes selecionados, visando estimular o crescimento de microrganismos autóctones de interesse e, ainda, a produção de biossurfactantes em fermentadores em etapas que antecedem a sua injeção nos reservatórios (Bordoloi e Konwar, 2007). Além dos inconvenientes já citados, a estratégia “*ex-situ*” apresenta ainda outras desvantagens, tais como: a

produção das moléculas dos surfactantes em larga escala representa um desafio, o processo de produção apresenta baixo rendimento além de altos custos de recuperação do produto final. Existe também a possibilidade de adesão dos surfactantes às partículas das frações iniciais do meio poroso, quando de sua injeção nos reservatórios (Mukherjee *et al.*, 2006). Os demais casos, por sua vez, requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir surfactantes ou que os microrganismos injetados consigam ser transportados e colonizem a rocha-reservatório (Banat *et al.*, 2000). Além disso, para serem úteis em MEOR “*in-situ*”, os microrganismos devem ser aptos a crescer nas condições extremas encontradas nos reservatórios, a exemplo de elevadas temperaturas, elevados níveis de pressão, altas concentrações salinas e baixas tensões de oxigênio (Cameotra e Makkar, 1998). Alguns autores obtiveram sucesso em trabalhos em escala de bancada isolando *Bacillus* spp. capazes de produzir surfactantes nas condições encontradas em muitos reservatórios. Assim, *B. licheniformis* BAS50 é capaz de crescer a 50 °C, produzindo surfactantes que reduzem a tensão superficial da água a valores próximos de 29 mN m⁻¹ e ainda estáveis em condições de salinidades superiores a 40 % (p/v) (Yakimov *et al.*, 1995). Da mesma forma, *B. licheniformis* JF-2 é capaz de crescer em anaerobiose estrita, em temperaturas superiores a 50 °C, salinidade de 10 % (p/v) de NaCl e em valores de pH variando entre 4,0 e 9,0 (Javaheri *et al.*, 1985). Esses autores relatam ainda que os biosurfactantes produzidos reduziram a tensão superficial da água para valores inferiores a 27 mN m⁻¹. Em ensaios de laboratório, biosurfactantes produzidos por *B. subtilis* C9 apresentaram amplo limite de estabilidade, mantendo suas propriedades emulsificantes em temperaturas variando de 20 a 100 °C, por até 1h e na faixa de pH entre 5,0 e 9,5 (Kim *et al.*, 1997). Outros estudiosos avaliaram o potencial para a aplicação de isolados de *B. licheniformis* em processos de MEOR, concluindo que esses microrganismos são capazes de crescer nas condições encontradas em muitos reservatórios, são capazes de produzir surfactantes em anaerobiose, em condições de salinidade de até 7,0% (p/v) de NaCl e em temperaturas de até 50 °C (Yakimov *et al.*, 1997).

Registros diversos na literatura confirmam, em testes em escala de campo, a recuperação de petróleo a partir do emprego de mecanismos de MEOR, baseados principalmente na atividade de

biossurfactantes. Na Alemanha, 200% de incrementos na recuperação de óleo foram registrados em campos maduros localizados naquele país (Hitzman, 1983). Investigações em poços pilotos da Burnett (USA) levaram à obtenção de valores superiores a cinco vezes o volume de óleo anteriormente recuperado. Isso se deu após a injeção de biossurfactantes, o que elevou a produção dos poços de 0,3 barril/dia para 1,6 barris/dia (Nelson e Launt, 1991). Outros pesquisadores constataram a produção de biossurfactantes lipopeptídeos em reservatórios de petróleo que atingiram concentrações médias de 90 mg L⁻¹, posteriormente à injeção de uma cultura mista composta de isolados de *Bacillus* sp. RS-1 e de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 (Youssef *et al.*, 2007). Na década de 1980, pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa Petrolífera (Oklahoma, USA), demonstraram recuperação de petróleo graças à injeção de bactérias produtoras de surfactantes nos poços produtores, seguida da injeção de nutrientes (Banat, 1991).

Apesar de apresentarem características fundamentalmente comuns aos surfactantes sintéticos, os surfactantes de origem microbiana exibem propriedades peculiares que os tornam bastante atrativos e comparativamente bem mais vantajosos, principalmente quando se trata da aplicação em processos de MEOR. Dentre essas propriedades, sua efetividade na recuperação de petróleo, sua alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, possibilidade de produção a partir de substratos renováveis e de baixo custo merecem destaque. Os biossurfactantes apresentam também ampla diversidade estrutural e funcional, o que garante importante flexibilidade perante a heterogeneidade encontrada nos reservatórios de petróleo (Banat, 1995; Banat *et al.*, 2000; McInerney *et al.*, 2004a).

Fatores físicos a exemplo de pH (Mukherjee e Das, 2005), temperatura (Tabatabaee *et al.*, 2005), salinidade (Makkar e Cameotra, 1997), agitação, aeração (Lima, 2003) e potencial redox (Davis *et al.*, 1999), associados ou não a fatores químicos, como a disponibilidade de micronutrientes (Wei e Chu, 1998) ou aos tipos e concentrações de fontes de carbono e nitrogênio (Kim *et al.*, 1997), podem afetar significativamente o crescimento microbiano e/ou os tipos, qualidade e quantidade de biossurfactantes produzidos. Vários trabalhos na literatura associam as condições de crescimento ao rendimento e aos

tipos de biossurfactantes produzidos pelos microrganismos. As fontes de carboidratos, por exemplo, exercem influência direta sobre os tipos de glicolipídios ou lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*, conforme observado por Makkar e Cameotra (1998). Ohno *et al.* (1995) observaram alterações na proporção de iturina A e surfactina, surfactantes produzidos por isolados de *B. subtilis* RB14, correlacionadas a variações nas condições de temperatura avaliadas nos ensaios.

Do ponto de vista microbiano, vários eventos que interferem direta ou indiretamente com o crescimento ou com a fisiologia geral dos microrganismos são atribuídos à ação de surfactantes por eles produzidos. Aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, complexação de metais pesados, patogenicidade, motilidade, regulação da adesão ou desorção de células, emulsificação, *quorum-sensing*, interferência na formação, maturação ou desagregação de biofilmes, facilitação do transporte microbiano em meios porosos, dentre outros, são alguns dos aspectos atribuídos à ação de surfactantes produzidos por microrganismos (Ron e Rosenberg, 2001). Os biossurfactantes exibem ainda propriedades antibióticas, anticoagulantes, hemolíticas e antivirais. Peptídeos cíclicos são freqüentemente caracterizados como moléculas antimicrobianas atuando como antibióticos naturais, a exemplo do lipopeptídeo surfactina (Carrillo *et al.*, 2003).

Bactérias identificadas como *B. subtilis* são caracterizadas como gram-positivas, formadoras de esporos, produtoras de ácidos e álcoois e anaeróbias facultativas, capazes de utilizar nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons (Sonenshein *et al.*, 1993). Uma importante característica da fermentação em *B. subtilis* é a produção de etanol, lactato e acetato, além de 2,3-butanodiol (Cruz *et al.*, 2000), um álcool que atua como um *co*-surfactante agindo sinergisticamente com outros surfactantes presentes no meio, aumentando a eficiência e a tolerância dos tensoativos à salinidade. O álcool 2,3-butanodiol é ainda capaz de evitar a formação de cristais líquidos de surfactantes, conforme relata Maudgalya (2005). A capacidade de produção de acetato e lactato pode ser importante em processos de MEOR, principalmente em formações carbonáceas, nas quais os ácidos produzidos podem alterar a estrutura dos poros da rocha, dissolvendo seu material constituinte e facilitando a mobilização do óleo (McInerney *et al.*, 2002).

Isolados de *B. subtilis* apresentam elevada capacidade de produção de surfactantes, tanto em condições aeróbias quanto em condições anaeróbias (Batista *et al.*, 2008; Fernandes, 2007; Lima, 2008; Rossmann, 2008). São capazes de produzir três tipos principais de surfactantes: surfactina, iturina e fengicina, com pequenas variações estruturais entre eles, embora suficientemente capazes de afetar suas atividades de modo apreciável (McInerney *et al.*, 2004b). A surfactina, pertencente à classe dos surfactantes lipopeptídicos e constituída por uma porção lipídica e outra protéica na molécula, merece destaque dentre os demais surfactantes (McInerney *et al.*, 2003). Apresenta uma série de funções biológicas exibindo propriedades bactericidas, fungicidas, antivirais, antitumorais e inibitórias na formação de coágulos (Barros *et al.*, 2007). Em 1968, a surfactina foi relatada por Arima *et al.* como um novo composto produzido por *B. subtilis* que exibia atividade biológica, sendo sua estrutura química completamente elucidada somente um ano após sua descoberta. Graças a sua excepcional atividade tensoativa de superfície recebeu aquela denominação. A surfactina é composta por uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em sua estrutura e em suas propriedades físico-químicas, em virtude de variações no tamanho de suas cadeias, ao local de ligação dos componentes hidroxi-ácidos graxos e a substituições dos aminoácidos componentes do anel (Barros *et al.*, 2007). Representa um dos agentes tensoativos mais efetivos e estudados até hoje, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72,0 para 27,9 mJ m⁻², em uma concentração de apenas 0,05 % (p/v) (Arima *et al.*, 1968; Cooper *et al.*, 1981). A surfactina é ainda capaz de reduzir tensões interfaciais a níveis extremos (< 0,01 mN m⁻¹), apresenta concentrações micelares críticas (CMC) geralmente baixas (10 mg L⁻¹), indicando grande efetividade mesmo em concentrações reduzidas (Ghojavand *et al.*, 2008). Sua molécula é composta de um heptapeptídeo cíclico (Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-D-Leu-Leu) ligado a uma molécula de ácido graxo β-hidróxi, variando entre 13 a 15 átomos de carbono (Sullivan, 1998; Barros *et al.*, 2007a), conforme apresentado na figura 1.

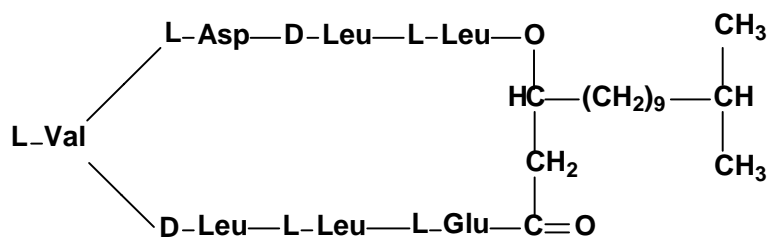


Figura 1 - Estrutura da molécula de surfactina.

A síntese da molécula de surfactina é mediada por um grande complexo enzimático, denominado peptídeo sintetase, responsável pela adição sequencial dos aminoácidos à molécula em formação por meio de ligações éster e amida (Das *et al.*, 2008).

A enzima peptídeo sintetase é codificada por quatro ORFs no operon *srfA*. Análises de mutantes *srf* revelaram um gene, *comS*, dependente do promotor de *srfA* para sua expressão e que estaria envolvido em mecanismos de competência. Devido a esse arranjo, o operon *srf* seria regulado por mecanismos envolvidos no desenvolvimento de competência, sendo um desses mecanismos o responsável pelo monitoramento da densidade celular no ambiente. Desse modo, um sistema *quorum-sensing* controlaria a expressão do gene *srfA* via um peptídeo sinal que acumula-se no meio em condições de alta densidade celular. Uma segunda molécula peptídeo sinal estaria relacionada a processos de esporulação responsável pela expressão de *srfA* em condições de baixa densidade celular e inibição de sua expressão em concentrações celulares elevadas, o que estimularia o início do processo de esporulação. Outra enzima, a *acil-transferase*, também é requerida no processo, sendo responsável pela transferência do ácido graxo ao primeiro aminoácido do heptapeptídeo (Sullivan, 1998).

Com relação aos isolados de *B. subtilis*, diversas cepas são capazes de crescer em considerável variabilidade de condições, sejam elas físicas ou químicas, na presença de substratos hidrofóbicos ou hidrofílicos. A produção de surfactantes pelas cepas de *B. subtilis*, no entanto, baseia-se principalmente no consumo de substratos hidrossolúveis, ao contrário de substratos lipossolúveis, a exemplo dos hidrocarbonetos (Sullivan, 1998). Carboidratos, como a glicose e a sacarose, além de resíduos da agroindústria, como melão, manipueira, soro de queijo, glicerina e outros, são as principais fontes de

carbono empregadas com vistas a incrementar a produção de surfactantes pelos isolados de *B. subtilis* (Joshi *et al.*, 2008c; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008, Nitschke & Pastore, 2006, Fox & Bala, 2000). O emprego de resíduos da agroindústria na produção de surfactantes tem recebido atenção especial nos últimos anos, principalmente devido às possibilidades de redução de seus custos de produção (Nitschke *et al.*, 2004, Rossman, 2008). O estímulo à produção de biodiesel, por exemplo, tem gerado quantidades expressivas de glicerina como subproduto do processo produtivo, que pode servir como substrato alternativo à produção de surfactantes por isolados de *B. subtilis* (Amaral *et al.*, 2009).

Vários trabalhos relatados na literatura descrevem a eficiência da produção de surfactantes por isolados de *B. subtilis* cultivados sob diferentes condições físicas e químicas. A linhagem *B. subtilis* 20B, cultivada em aerobiose, foi capaz de crescer em diferentes fontes de açúcares, alcoóis e hidrocarbonetos, embora demonstrasse produção de surfactantes em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono, cujas tensões superficiais foram reduzidas a $29,5 \text{ mN m}^{-1}$ e as tensões interfaciais contra *n*-hexadecano a $4,5 \text{ mN m}^{-1}$. Aquela linhagem foi ainda capaz de crescer a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e no meio de cultura contendo 7,0 % (p/v) de NaCl (Joshi *et al.*, 2008). Makkar & Cameotra (1997;1998), por sua vez, observaram que determinadas linhagens de *B. subtilis* produtoras de surfactantes são capazes de crescer em altas concentrações salinas, 7,0% (p/v) de NaCl, em ampla faixa de pH (4,5 a 10,5), constatando ainda que os surfactantes produzidos nessas condições propiciavam a recuperação de 56% a 62% do óleo (>31 °API) contido em núcleos porosos de areia. Youssef *et al.* (2007), trabalhando em condições de campo com culturas mistas de isolados de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* e de isolados de *B. subtilis*, também comprovaram grande eficiência daqueles isolados na produção de surfactantes (90 mg L^{-1}) e na recuperação de petróleo dos poços onde foram inoculados..

Isolados de *B. subtilis* são considerados os microrganismos mais indicados para a aplicação em pesquisas e em processos de MEOR. A capacidade de produzirem surfactantes efetivos, principalmente nas condições adversas encontradas nas jazidas, e a capacidade de formarem esporos os colocam em evidência dentre as demais espécies bacterianas potencialmente aplicáveis em processos de recuperação

de petróleo. Seus esporos apresentam tamanho reduzido em relação às suas células vegetativas, resistem à dessecação, à limitação de nutrientes, a temperaturas e pH extremos (McInerney *et al.*, 2004). Além disso, os esporos foram considerados candidatos incomparavelmente melhores que células vegetativas no transporte em arenitos tipo Berea para uma mesma cepa de *B. subtilis* (Jang *et al.*, 1983). Esses autores observaram que a injeção de células na forma vegetativa no interior de sistemas porosos potencializou a ocorrência de entupimentos, sobretudo pelo seu tamanho, enquanto o emprego de endósporos, em concentrações similares, diminuiu a ocorrência daqueles entupimentos. Concluíram também que como os esporos estão em estado de dormência, a injeção de nutrientes para manter sua viabilidade não é requerida e, dessa forma, são capazes de serem transportados a distâncias ainda maiores que as células vegetativas.

Outros estudos comprovam que a aplicação de misturas de surfactantes pode propiciar melhores resultados de recuperação de óleo que a aplicação de soluções contendo um único tipo de molécula tensoativa. A menor eficiência de soluções puras de surfactantes em mobilizar o óleo é atribuída à ocorrência de repulsão de cargas intermoleculares e às propriedades hidrofílicas / hidrofóbicas dessas moléculas, que não propiciam a formação de estruturas macromoleculares (micelas) efetivas na mobilização de óleo. Surfactantes em mistura são capazes de aumentar as probabilidades de alinhamento das moléculas detergentes de forma a reduzir a repulsão das cargas ou interações hidrofóbicas indesejáveis (McInerney *et al.*, 2003).

Em situações em que se busca a produção de surfactantes no interior de meios porosos, a exemplo dos reservatórios de petróleo, faz-se necessária a execução de ensaios prévios de transporte celular visando definir, dentre outros fatores, a concentração de células a ser injetada e a força iônica do fluido carreador. Ao se empregar duas ou mais espécies microbianas, buscando a obtenção de misturas de surfactantes, é necessário ainda certificar-se da ocorrência de interações intra ou intercelulares. Fenômenos de *co-* ou *auto-*agregação, por exemplo, podem provocar entupimentos que interrompem o

transporte celular nos sistemas porosos e inviabilizam o processo de recuperação de óleo que se busca (Abram, 2000).

O estudo do transporte de bactérias ao longo de meios porosos é de fundamental importância na implementação de operações de MEOR e em processos de biorremediação, sobretudo em solos e em águas subterrâneas contaminados. Em MEOR, além da estratégia de produção de surfactantes por isolados injetados em sistemas porosos, o crescimento de células em regiões de alta permeabilidade naqueles sistemas pode levar a entupimentos que acabam por aumentar a recuperação final de óleo, ambos processos dependentes de um transporte celular efetivo ao longo dos meios porosos. Quando a biorremediação *in-situ* é a estratégia escolhida para a ação remediadora, seu sucesso dependerá do transporte e distribuição das linhagens ao longo de toda a pluma contaminada (Cunningham *et al.*, 2007). Além desses, outros aspectos relativos à poluição ambiental são diretamente dependentes dos fatores que interagem e interferem no transporte microbiano em sistemas porosos. Dentre eles, é possível citar o aumento da mobilidade de radionuclídeos pela associação destes com células microbianas, a liberação de microrganismos geneticamente modificados em aquíferos ou ainda o uso de bactérias em processos de tamponamento seletivo (Fontes *et al.*, 1991).

O transporte de bactérias ao longo de meios porosos pode ser visto como um processo governado pela filtração exercida pelo meio (retenção de células ou agregados celulares em seus poros), pela sedimentação celular nas porções porosas e ainda por reações de sorção-dessorção. Os fatores que influenciam a sorção de bactérias nos meios porosos incluem a natureza daquele meio (tipo de solo ou rocha, tamanho dos grãos que o compõem, conteúdo de argila e matéria orgânica) a constituição química do soluto, o pH e a força iônica. Além desses, fatores microbiológicos também influenciam a sorção de microrganismos em meios porosos. Esses fatores incluem a viabilidade celular, a hidrofobicidade dos envoltórios celulares, o tamanho e a forma das células, a presença de polissacarídeos extracelulares, eventos de predação ou parasitismo e a motilidade dos microrganismos ao longo dos sistemas porosos (Bossolan, 2000). Aslam *et al.* (2009) observaram que cepas de *B. subtilis* foram capazes de crescer e

migrar em colunas de vidro empacotadas com areia e saturadas com petróleo, sendo que a migração verificada interferiu de modo significativo na recuperação do óleo contido naquelas colunas. Além desses fatores, quanto menor a permeabilidade dos meios porosos maior é a probabilidade de adesão celular às suas superfícies, graças, sobretudo, à redução da velocidade do fluido carreador das células ao longo dos sistemas (Sarkar *et al.*, 1994). Outras causas de retenção celular no interior dos meios porosos relacionam-se geralmente a eventos de exclusão por tamanho ou a entupimentos diversos. Os entupimentos são causados principalmente pela injeção de suspensões celulares concentradas, contendo 10^7 UFC mL⁻¹ ou mais, responsáveis por obstruções dos canais porosos devido à grande massa celular neles retida (Sarkar *et al.*, 1994).

Além desses, a interação de bactérias com as superfícies inertes dos meios porosos pode levar a adesão celular induzida por uma série de combinações de fatores que influenciam no tipo de interação. A hidrofobicidade, a existência de cargas superficiais, a composição química das superfícies inertes, a rugosidade das superfícies e a composição do fluido carreador das bactérias, associado ainda a vazão desse fluido, são alguns dos fatores que interferem na interação célula-partículas do sistema (Sarkar *et al.*, 1994). Fontes *et al.* (1991) estudaram a influência da força iônica, do tamanho dos grãos constituintes do meio poroso e a influência do tamanho celular sobre o transporte de duas linhagens de bactérias ao longo de colunas empacotadas com areia. Concluíram em seus trabalhos que o tamanho dos grãos é o fator predominante, dentre aqueles avaliados, no controle do transporte bacteriano ao longo dos sistemas porosos. Observaram que colunas empacotadas com grãos de areia mais grossos permitiram maior recuperação celular comparativamente às colunas empacotadas com areia de menor granulometria. A força iônica, por sua vez, respondia de maneira inversamente proporcional à eficiência de transporte, ou seja, o aumento da força iônica propiciava maior retenção celular e menor eficiência de transporte. Isso poderia ser explicado pelo aumento da disponibilidade de íons em solução, o que levaria à formação de pontes entre sítios carregados na superfície dos grãos do meio poroso e na superfície das células (Bossolan, 2000). Desphande e Shonnard (2000) estudaram os efeitos da força iônica sobre o transporte

de *Pseudomonas fluorescens* UPER-1 em colunas de vidro empacotadas com areia. A partir de suas observações concluíram que em suspensões celulares, contendo sais fosfato (sódio e potássio) em concentrações superiores a 10^{-3} M, havia uma queda significativa na eficiência de transporte ao longo dos meios porosos. Essa queda foi atribuída à elevada concentração dos sais fosfato na suspensão celular.

O tamanho e a forma das células também são fatores que podem influenciar sua sorção em meios porosos. Weiss (1995) observou que bactérias esféricas e menores eram transportadas em colunas empacotadas com areia bem mais facilmente que bastonetes de maior tamanho. Outros pesquisadores, por sua vez, observaram que a hidrofobicidade dos envoltórios celulares relacionava-se de forma direta e proporcional à sorção de bactérias em constituintes do solo, ou seja, quanto maior a hidrofobicidade dos envoltórios das células maior sua sorção na superfície dos grãos de areia (Want *et al.* em Crawford e Crawford, 1996).

Alguns pesquisadores constataram ainda que surfactantes naturais ou sintéticos podem auxiliar no transporte de microrganismos em meios porosos. Bai *et al.* (1997) investigaram a influência de um surfactante rhamnolípido aniônico sobre o transporte de três linhagens de *Pseudomonas*, com diferentes hidrofobicidades, ao longo de um sistema poroso sob condição saturada. Colunas empacotadas com areia estéril foram saturadas com água subterrânea artificial e três volumes porosos (3VP) de suspensões bacterianas marcadas com H^3 , com variadas concentrações de rhamnolídeos, foram injetadas nas colunas. O surfactante rhamnolípido potencializou o transporte de todos os tipos celulares testados, porém, em diferentes intensidades. Estudos de recuperação da linhagem mais hidrofílica mostraram aumentos de 22,5 a 56,3%, a recuperação de linhagens com grau intermediário de hidrofobicidade apresentou aumentos de 36,8 a 49,4% e a recuperação das linhagens mais hidrofóbicas variaram entre 17,7 a 40,5%.

Petróleo pesado é aquele que apresenta densidade entre 0,934 a 1,00 g/cm³ (10 a 20 ° API), medida em temperatura ambiente. É também caracterizado pela baixa razão hidrogênio/carbono, pelo baixo conteúdo de hidrocarbonetos leves, pela abundância de alcanos de cadeia longa e também pela

presença de moléculas de enxofre, oxigênio e nitrogênio, além de alguns metais pesados, a exemplo de vanádio e níquel (Martinez, 1984; Tissot e Welte, 1984 apud Barbosa, 2004). Os métodos físicos empregados em sua recuperação são bastante onerosos, muitas vezes ineficazes e com grande potencial para a geração de danos ambientais. Por isso, sistemas microbianos vêm sendo testados e empregados em reservatórios de óleo pesado, a fim de superar os problemas e os desafios de sua recuperação baseada em métodos puramente físicos (Hao e Lu, 2009).

Na grande maioria dos casos, os óleos pesados são originados do óleo cru degradado no reservatório por processos biológicos, pela perda de voláteis e por oxidação inorgânica. São, portanto, produtos residuais que ocorrem em rochas porosas, onde o petróleo migra, acumula-se e torna-se degradado (Barbosa, 2004). A tecnologia rotineiramente aplicada em sua recuperação relaciona-se à redução de sua viscosidade empregando-se energia térmica. Métodos de injeção de vapor e de combustão parcial *"in-situ"*, desenvolvidos originalmente para os campos petrolíferos da Califórnia e da Venezuela, viabilizaram a produção de petróleo pesado naqueles países, sobretudo em campos considerados não-comerciais pelos métodos de recuperação convencionais. A injeção de vapor, em particular, veio a se consagrar como a única alternativa economicamente viável para o aproveitamento de óleos pesados. No Brasil, essa tecnologia é largamente empregada em campos localizados na região Nordeste, sendo testada também em acumulações da Bacia do Espírito Santo. Outra categoria de métodos de recuperação, em estágio avançado de desenvolvimento, baseia-se na injeção de gases miscíveis ou parcialmente miscíveis, igualmente capazes de promover a redução da viscosidade do óleo. É o caso da injeção de gás carbônico, nitrogênio ou do próprio gás natural de petróleo (Mezzomo e Schiozer, 2001).

As reservas mundiais de óleo pesado e extrapesado ($^{\circ}\text{API} < 10$) somam 6 trilhões de barris, volume que supera em aproximadamente três vezes o total de óleo convencional, do qual aproximadamente a metade já foi produzido. Com relação às reservas provadas, desconsiderando-se o betumem, os valores apontam para a cifra mundial de 434 bilhões de barris, mais de 60% dos quais

localizados na Venezuela. Sua recuperação, no entanto, muitas vezes ainda representa um grande desafio. No ano de 2000, por exemplo, de um total de 25 bilhões de barris de petróleo produzidos no mundo, os óleos pesados responderam por apenas 3 bilhões de barris. É preciso considerar ainda que grande parte do óleo não recuperado em campos de petróleo convencional é constituída de frações pesadas com as mesmas características dos óleos pesados, o que contribui para aumentar ainda mais a importância do desenvolvimento de estratégias de recuperação de óleos com baixos graus API (Bannwart e Trevisan, 2006).

No Brasil, a descoberta de óleos pesados tem revelado valores importantes e significativos. Segundo dados de 2004, há uma reserva provada de petróleo pesado que soma 2,9 bilhões de barris, grande parte situada em campos marítimos. Em médio prazo, essa parcela poderá se duplicar, com a implantação de novos projetos de produção que podem incorporar às reservas grandes volumes já descobertos. Tais projetos, no entanto, são baseados em tecnologias usualmente empregadas para óleos leves. Para a elaboração de projetos que assegurem a recuperação de frações significativas de óleo pesado é de fundamental importância o desenvolvimento de novas tecnologias de produção voltadas exclusivamente para aquele tipo de óleo (Bannwart e Trevisan, 2006).

Em decorrência das novas descobertas, companhias como a Shell e a Petrobras começaram a dar maior prioridade para projetos tecnológicos voltados para óleos pesados. Em 2001, foi anunciada a descoberta de uma grande jazida no bloco BS-4, na Bacia de Santos, com uma reserva aproximada de 500 milhões de barris. O óleo extraído para testes revelou 15 °API, caracterizando-se, portanto, como óleo de natureza pesada. Além dessa, atividades exploratórias nas bacias de Campos (RJ) e do Espírito Santo também têm levado à descoberta de óleos pesados, embora sua incorporação às reservas nacionais esteja impossibilitada pelas dificuldades inerentes à sua recuperação (Shecaira, *et al.* 2002).

A ação de biossurfactantes, eficazes na redução de tensões interfaciais água-óleo e óleo-rocha, pode facilitar a mobilização e recuperação do óleo pesado graças à redução das forças capilares que mantêm o óleo aderido à matriz rochosa. Experimentos em colunas empacotadas com areia, saturadas

com óleo pesado (14,4 °API), demonstraram que extratos de surfactantes produzidos em anaerobiose por isolados de *B. subtilis* são efetivos na mobilização do óleo pesado aderido às partículas do meio poroso, recuperando até 9,43 % de seu volume original (Batista, 2008). Outras bactérias são ainda capazes de quebrar ligações de enxofre orgânico presente em moléculas de hidrocarbonetos constituintes do petróleo pesado, levando à degradação de asfaltenos que contribuem para a alta viscosidade característica daquele tipo de óleo. Isso é possível já que os heteroátomos de enxofre são os responsáveis pela manutenção da união dos anéis heteropolicíclicos (Pineda-Flores *et al.*, 2004). A eliminação dessas ligações pode reduzir em até quatro vezes a massa molecular e a viscosidade daquele tipo de petróleo (Kirkwood *et al.*, 2003). Experimentos realizados com a bactéria *S. maltophilia* LBBMA 101b demonstraram que essa bactéria é capaz de reduzir a concentração de hidrocarbonetos de elevada massa molecular em amostras de petróleo pesado (14,4 °API) (Marinho, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais), no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais (LPPN) do Departamento de Química da UFV e no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.1. Seleção dos isolados produtores de surfactantes

3.1.1. Microrganismos

Os estudos foram conduzidos com isolados de *Bacillus* spp., pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente e isolados de amostras de óleo e de água de produção provenientes de reservatório de óleo pesado (14,4 °API e densidade 0,983 g/cm³) localizado no distrito de Itaúnas, município de Conceição da Barra - ES. O reservatório caracteriza-se por apresentar temperatura média de fundo de 58 °C e salinidade de 7,9 % (p/v), aproximadamente.

Um total de 12 isolados do gênero *Bacillus* (Tabela 2), originários da formação Rio-Itaúnas e caracterizados como produtores de surfactantes em aerobiose nos meios M1, M2, M3 e ME foram avaliados quanto à capacidade de produção de surfactantes em anaerobiose, nos mesmos meios minerais (Tabelas 3 e 4), contendo glicose ou sacarose como fontes de carbono a 2,0 % (p/v), em salinidades de 3, 5, 7 e 8,0 % (p/v) de NaCl e incubados a 34, 37, 45 e 58 °C. Os valores máximos de salinidade e de temperatura selecionados aproximam-se das condições encontradas no reservatório de origem.

Tabela 2 – Isolados de *Bacillus* spp. originários de amostras de óleo e de água de produção da formação Rio-Itaúnas e caracterizados como produtores de surfactantes em aerobiose nos meios M1, M2, M3 e ME

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO
LBBMA 4906	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>
LBBMA 4914	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>
LBBMA 4915	<i>Bacillus sphaericus</i>
LBBMA 4951	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>
LBBMA 4963	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>
LBBMA 4964	<i>Bacillus subtilis</i>
LBBMA 4965	<i>Bacillus subtilis</i>
LBBMA 4966	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>
LBBMA 4967	<i>Bacillus subtilis</i>
LBBMA 4969	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>
LBBMA 4978	<i>Bacillus licheniformis</i>
LBBMA 4979	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>

Os isolados foram identificados pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) utilizando o sistema Sherlock da Microbial Identification System® (MIDI Newark, DE, EUA) e a biblioteca de referência ITSA 1.0®.

Tabela 3 - Composição dos meios minerais M1, M2 e M3 (g L⁻¹) empregados no cultivo dos isolados de *Bacillus* durante a triagem de produtores de surfactantes

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g L ⁻¹)		
	M1	M2	M3
Na ₂ HPO ₄	-	2,7	2,7
KH ₂ PO ₄	0,5	1,4	1,4
K ₂ HPO ₄	1,0	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,5	0,5
NaNO ₃	1,0	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,154	0,154	0,154
K ₂ SO ₄	0,36	0,36	0,36
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01	0,01	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,027	0,027	0,007
NaCl	0,1	0,1	0,1
Extrato de levedura	0,01	0,01	0,01
* Solução de micronutrientes	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
pH	6,8	6,8	6,8

Fonte: Lima (2003).

*Solução de Micronutrientes	g L ⁻¹
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,525
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,705
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
H ₃ BO ₃	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,015

Fonte: Banat *et al.* (1991).

Tabela 4 - Composição do meio mineral ME utilizado nos experimentos de triagem de isolados de *Bacillus* produtores de surfactantes

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	13,9
KH ₂ PO ₄	2,7
Extrato de Levedura	1,0
Peptona Proteose	3,0
NaNO ₃	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄	0,25
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001
EDTA	1,0
MnSO ₄ · H ₂ O	3,0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1
CoCl ₂ · 2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₄	0,01

Fonte: Reasoner e Geldreich (1985).

As etapas em anaerobiose foram conduzidas em câmara anaeróbia Anaerobic System® (Thermoforma®), sob atmosfera de 5,0 % de CO₂, 10 % de H₂ e 85 % de N₂. Todas as soluções-estoque e os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos e desoxigenados por repetidas sessões de evacuação e repressurização com 100 % de N₂. Esses procedimentos foram executados em etapa anterior a entrada dos frascos no compartimento interno da câmara.

Frascos de penicilina de 30 mL preenchidos com 20 mL dos diferentes meios de cultura avaliados foram suplementados com sacarose ou glicose a 2,0 % (p/v) e então inoculados com as culturas de *Bacillus* spp. em anaerobiose. Para a obtenção dos pré-inóculos, os isolados armazenados em ultrafreezer a -80 °C foram descongelados, inoculados em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL dos meios de cultura avaliados e nas concentrações de NaCl definidas e posteriormente incubados em aerobiose a 30 °C, 200 rpm por 18 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos de centrifuga tipo Falcon® e centrifugadas a 9000 g (Sorvall® - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuscitado em 5 mL de solução salina estéril nas respectivas concentrações de NaCl dos meios e homogeneizado em agitador tipo “vortex” para uma segunda etapa de centrifugação. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo a última ressuspensão executada em anaerobiose, empregando-se nessa etapa solução salina anaeróbia. Células foram transferidas para os frascos de penicilina de forma a se obter um valor de densidade ótica inicial a 600nm (DO₆₀₀) igual a 0,1. Em seguida, os frascos foram vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio e incubados estaticamente por 120 horas dias em incubadoras BOD nas temperaturas testadas. Transcorrido o período de incubação, o volume neles contido foi coletado e submetido à análise de tensão superficial pelo método do anel de du Nouy (Cooper *et al.*, 1979), utilizando-se tensiômetro Fisher Surface Tensiomat® Modelo 21 (Pittsburgh, EUA). As amostras que produziram valores de tensão superficial inferiores a 40 mN m⁻¹ indicaram os isolados selecionados para os experimentos subseqüentes de transporte celular, produção e caracterização de biossurfactantes recuperados de meios porosos e experimentos de recuperação de óleo pesado injetado naqueles meios. Os ensaios de triagem dos isolados de *Bacillus* produtores de surfactantes foram conduzidos em duplicata para todas as condições testadas.

3.2. Ensaios de transporte celular

3.2.1. Condições de cultivo e obtenção dos inóculos

Os isolados selecionados na etapa de triagem de produtores de surfactantes foram utilizados em experimentos de transporte na forma de células vegetativas e de esporos e em experimentos de avaliação da produção de biosurfactantes no interior de meios porosos não-consolidados (colunas de vidro empacotadas com areia). As bactérias foram reativadas em frascos Erlenmeyer contendo meio ME adicionado de glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v) em condição aeróbia. As culturas foram incubadas a 30 °C e 200 rpm por 15 h para a obtenção dos pré-inóculos. Em seguida, foram executadas as quatro seqüências de lavagens e ressuspensões em solução salina NaCl 5,0 % (p/v), sendo a última ressuspensão em solução salina anaeróbia. O volume final inoculado nos frascos de penicilina, contendo 20 mL de meio ME, foi o suficiente para a obtenção de um valor inicial de DO_{600} igual a 0,1. Os frascos foram vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio e incubados em BOD a 34 °C, temperatura selecionada na etapa anterior de avaliação da produção de surfactantes em meio ME. Com vistas a definir os tempos de cultivo correspondentes ao final da fase logarítmica de crescimento e avaliar a concentração celular em $UFC\ mL^{-1}$ naquele estágio, foi construída uma curva de crescimento dos isolados selecionados relacionando densidade óptica (DO_{600}) com tempo de cultivo e posteriormente outra curva relacionando $UFC\ mL^{-1}$ com os tempos correspondentes ao final da fase log até início da fase estacionária a partir de plaqueamentos das culturas dos isolados em meio ágar-nutriente (Isofar® Química, Rio de Janeiro-RJ).

Para a obtenção de esporos dos isolados selecionados foi empregada a metodologia descrita por Foerster e Foster (1966), cujo meio esporogênico apresentava a seguinte composição por litro: 1,0 g de glicose; 1,0 g de L-glutamato de sódio; 0,5 g de extrato de levedura; 5,0 g de KH_2PO_4 ; 1,0 g de $(NH_4)_2HPO_4$; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g de NaCl; 0,05 g de $CaCl_2$; 0,007 g de $MnSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,01 g de $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,01 g de $FeSO_4$ e 15 g de ágar. Ao meio de cultura solidificado em placas de petri foi adicionado 0,5 mL das suspensões bacterianas com valor de DO_{600} ajustada para 1,0. A referida

suspensão foi previamente cultivada em meio caldo nutriente a 30 °C, por 12h e a 200rpm. As placas de petri foram incubadas por 72 h a 37 °C em incubadora BOD. Transcorrido esse período, os esporos foram removidos assepticamente da superfície do meio sólido com o auxílio de alça de repicagem e lavados em água destilada por 3 vezes sob centrifugação a 9000 g por 15 min. A suspensão final de esporos foi mantida em água milliQ Millipore® sob refrigeração a 4 °C até posterior utilização.

A presença de esporos na suspensão foi avaliada no momento de sua utilização por meio da metodologia de coloração de *Wirtz-Conklin* (Hamouda *et al.*, 2002) com o emprego de solução aquosa do corante verde-malaquita a 5 % (p/v) e safranina como contra-corante. As preparações fixadas em lâminas foram visualizadas e as imagens resitradas em microscópio óptico de luz polarizada (Olympus® BX-50 provido de kit polarização e sistema de captura de imagens Olympus® QColor 3®).

Suspensões de células vegetativas em tampão PBS de composição (g L⁻¹): NaCl 8,5; K₂HPO₄ 1,23 e KH₂PO₄ 0,4, e suspensões de esporos em água milliQ Millipore® dos isolados selecionados foram diluídas em salina NaCl 0,85% (p/v) e plaqueadas em meio ágar-nutriente. Por meio desses procedimentos foram definidos os volumes necessários para a obtenção de concentrações de inóculos correspondentes a 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFC mL⁻¹ aproximadamente, valores selecionados para os experimentos de transporte de células vegetativas e de esporos dos isolados selecionados ao longo dos meios porosos não-consolidados.

3.2.2. Transporte dos isolados selecionados em meios porosos não-consolidados

Os meios porosos não-consolidados foram constituídos de areia de quartzo de 150-200 µm, lavada em ácido e acondicionada em colunas de vidro tipo Pyrex® de 65 mm de comprimento e 25 mm de diâmetro interno. As extremidades das colunas foram vedadas com estruturas em aço inox contendo aberturas centrais para a conexão de tubulações de silicone. O empacotamento das mesmas foi executado de forma a se obter menores vibrações possíveis com a deposição manual de areia no topo das

colunas, conforme metodologia descrita por Dalla (2005). As colunas empacotadas foram saturadas com 100 % de N_2 por 5 minutos, tiveram suas aberturas vedadas com fita Vedarosca® e esterilizadas em autoclave (121 °C por 20 min).

Durante os experimentos de transporte as colunas foram operadas em modo de fluxo ascendente ($0,3 \text{ mL min}^{-1}$) visando minimizar os efeitos da gravidade. A injeção dos fluidos nas mesmas foi executada com o auxílio de bomba peristáltica de fluxo variável (Masterflex® 7553-30, Cole-Parmer, USA), empregando tubulações de 0,03 mm de diâmetro interno (Tygon® LFL Tubing L/S® 13, Cole-Parmer, USA) conectadas às extremidades das colunas. O volume poroso (VP) de cada uma delas foi determinado pela diferença entre os pesos do sistema seco e saturado com solução de tampão PBS. Foram injetados 10 VPs das suspensões de células vegetativas ou de esporos dos isolados selecionados, na forma de cultura pura e, posteriormente na forma de cultura mista, em concentrações equivalentes a 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC mL^{-1} aproximadamente. A concentração inicial (UFC mL^{-1}) das suspensões, designada como C_0 - *concentração celular do influente*, foi determinada pelo uso da técnica de microgotas, plaqueando-se alíquotas de 10 μL em meio ágar-nutriente após diluição em salina NaCl 0,85 % (p/v). As suspensões de injeção permaneceram sob constante agitação com o auxílio de agitadores magnéticos ao longo de todo o período de execução dos experimentos de transporte. Amostras dos efluentes das colunas foram coletadas em intervalos correspondentes a cada volume poroso injetado e diluídas em NaCl a 0,85 % (p/v). Com o emprego da técnica de microgotas foi determinada a concentração de células recuperadas ao final do processo de transporte, sendo esta concentração designada pela letra C - *concentração celular nos efluentes das colunas*. A partir dos dados assim obtidos, foram construídos gráficos relacionando C/C_0 versus VP, tornando possível a avaliação da eficiência de transporte nos diferentes tratamentos avaliados e posteriormente a seleção das condições que propiciam menor retenção celular ou maior recuperação de células nos efluentes das colunas. Os ensaios de transporte foram conduzidos em capela de fluxo laminar de todas as soluções empregadas foram previamente autoclavadas..

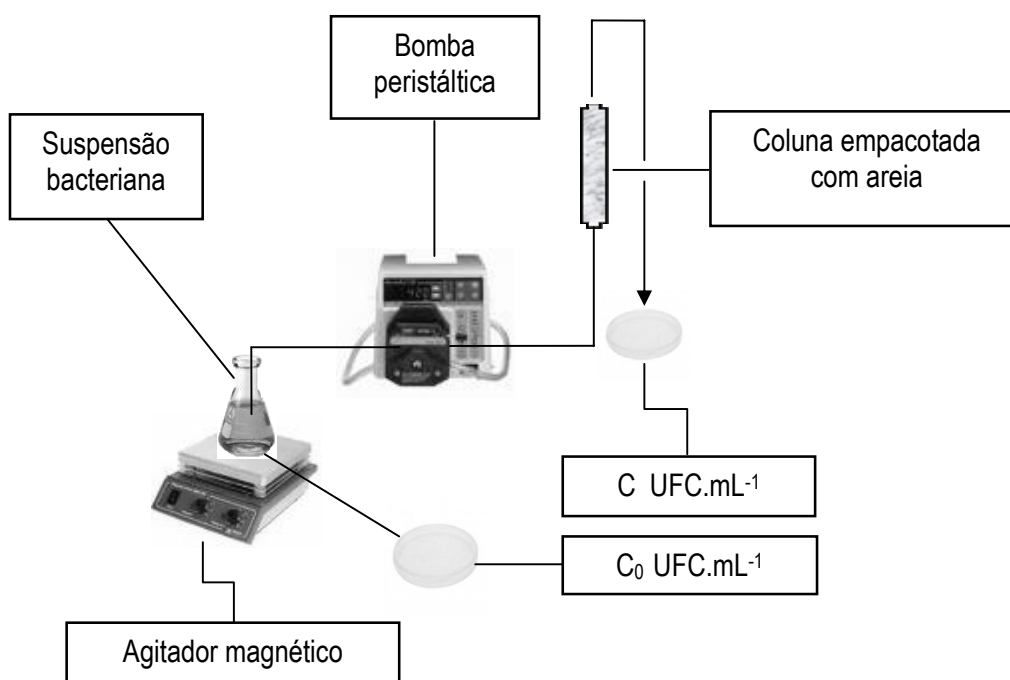
Foi determinada também a hidrofobicidade dos envoltórios celulares dos isolados selecionados, tanto na forma de células vegetativas quanto na forma de esporos, seguindo metodologia adotada por Foegeding (1990). Inicialmente, suspensões celulares dos isolados selecionados, incubadas por 12 h a 30 °C e 200 rpm, foram lavadas duas vezes em solução salina NaCl 5 % (p/v) por meio de centrifugação a 9000 g por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas de 3 mL das suspensões foram transferidas para tubos de fundo redondo de 10 mm de diâmetro interno e homogeneizadas para a determinação da DO₆₀₀ com o auxílio de um espectrofotômetro (SmartSpec TM3000, BIO-RAD®). Foi adicionado um volume de 0,3 mL de *n*-hexadecano àquela suspensão, seguindo-se da agitação da mistura em agitador tipo *vortex* por 2 minutos. Visando à obtenção da densidade óptica final prosseguiu-se com 15 minutos de repouso para a mistura e nova determinação da absorbância. De posse desses dados, o cálculo da porcentagem de hidrofobicidade foi efetuado com o emprego da seguinte fórmula:

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = (1 - \text{DO}_{\text{final}} / \text{DO}_{\text{inicial}}) \times 100$$

Foi testada nessa etapa do trabalho a eficiência de transporte de células vegetativas e de esporos dos isolados selecionados suspensos em tampão PBS e na forma de cultura pura, atentando-se visualmente para a eventual ocorrência de fenômenos de *co*-agregação ou *auto*-agregação. Em seguida, foi testada a eficiência de transporte daqueles isolados em cultura mista e suspensos tanto em tampão PBS quanto em meio E contendo NaCl a 5,0 % (p/v) e glicose a 2,0 % (p/v).

Considerando-se a natureza antibiótica de surfactantes lipopeptídeos produzidos por isolados de *B. subtilis*, foram estabelecidas curvas de crescimento para cada um dos isolados selecionados cultivados na presença de extratos de surfactantes, produzidos por culturas mistas dos mesmos, comparando-as com curvas de crescimento obtidas para cada isolado na ausência daqueles extratos. Em ambos os casos, os isolados foram cultivados em aerobiose, em meio ME contendo NaCl a 5,0 % (p/v) e glicose a 2,0 % (p/v), a 30 °C e 200 rpm por 12 h.

Abaixo, o diagrama esquemático ilustra a seqüência e o aparato experimental empregados durante os experimentos de transporte dos isolados ao longo dos meios porosos não-consolidados.



Esquema 1 – Ilustração da seqüência e aparato experimental empregados nos experimentos de transporte dos isolados selecionados em meios porosos não-consolidados.

3.3. Detecção, avaliação da natureza e quantificação de biossurfactantes recuperados dos meios porosos

A presença, a natureza e a quantificação de biossurfactantes, especialmente a surfactina, produzidos pelas culturas puras e mistas dos isolados selecionados e inoculados nos meios porosos não-consolidados, foi determinada com base na análise de amostras de efluentes recuperados daqueles meios. As colunas empacotadas com areia permaneceram incubadas em BOD a 34 °C por um período de 96 h após sua inoculação com 3 VPs de esporos das culturas mistas. Em intervalos de 24 horas, ao longo das primeiras 48 horas, o meio poroso foi saturado com meio ME, contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v), em volume correspondente a 1VP para cada coluna. Transcorrido o período de incubação, foi injetado nos meios porosos fluido de extração, solução salina NaCl a 5,0% (p/v), em volume suficiente para a obtenção de 10 mL de efluentes. Volumes de 30 mL, correspondentes aos efluentes recuperados de um total de 3 colunas, foram transferidos para tubos de centrífuga tipo Falcon®, centrifugados a 9000 g por 10 minutos em temperatura ambiente, obtendo-se assim um sobrenadante livre de células e de particulados suspensos, tomado como o extrato inicial de biossurfactantes. Um total de 10 mL desse extrato foi usado para avaliar sua tensão superficial pelo método do anel de du Nouy (Cooper *et al.*, 1979) utilizando-se tensiômetro Fisher Surface Tensiomat® modelo 21 (Pittsburgh, EUA). Foi também estimada a concentração relativa de surfactantes por meio da determinação de sua diluição micelar crítica (DMC), a partir do mesmo volume de 10 mL de efluente usado na avaliação da tensão superficial. As diluições do volume de efluente recuperado foram preparadas em água milliQ Millipore®, sendo a tensão superficial das diluições quantificada em tensiômetro. A DMC foi estimada após a elaboração de gráficos de tensão superficial *versus* diluição como o recíproco da diluição micelar crítica, na qual a tensão superficial começa a aumentar (Cooper *et al.*, 1979). Foi avaliada ainda a presença de ácidos orgânicos e do álcool 2,3-butanodiol, em alíquotas de amostras dos mesmos efluentes (item 3.4).

Confirmados valores de tensões superficiais indicativos da possível presença de surfactantes naquelas amostras (tensões < 40 mJ m⁻²), foi dado início a etapa de identificação dos surfactantes presentes, empregando espectroscopia do infra-vermelho com transformada de Fourier (FT-IR), prioritariamente a surfactina (item 3.5.1), e quantificação da mesma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (item 3.5.2). Além disso, foi avaliado também o índice de emulsificação inicial (EI) e a estabilidade das emulsões dos surfactantes presentes nos efluentes das colunas (E24) (item 3.5.4).

3.4. Detecção de produtos de fermentação nos efluentes de colunas inoculadas

Amostras de fluidos coletados dos meios porosos não-consolidados, inoculados com culturas puras e mistas dos isolados selecionados, foram avaliadas quanto à presença dos ácidos acetato, lactato e succinato e do álcool 2,3 - butanodiol. Foi empregado HPLC modelo 1050 (Hewlett Packard®, Palo Alto, CA), equipado com detector de índice de refração (HP 1047A) e coluna BIO-RAD® Aminex HPX-87H (370 X 7,8 mm) mantida a 60 °C. Conforme Fernandes (2007), uma solução de H₂SO₄ (0,01 N) foi usada como fase móvel ao fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Foram usados 20 µL de cada amostra para cada análise cromatográfica. Os metabólitos encontrados foram identificados e quantificados, respectivamente, pela comparação de seus tempos de retenção e das áreas de seus picos com aqueles de padrões conhecidos.

3.5. Produção de surfactina no interior dos meios porosos não-consolidados

3.5.1. Avaliação da presença de surfactina em efluentes recuperados dos meios porosos inoculados

A presença de surfactina nos efluentes das colunas inoculadas com os isolados na forma de culturas puras e mistas foi elucidada por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Inicialmente, amostras de 30 mL de efluentes das colunas foram submetidas à centrifugação em tubos de centrífuga tipo Falcon® a 9000 g por 10 minutos, visando à separação das células e dos materiais particulados em suspensão. Os surfactantes dispersos no sobrenadante do centrifugado foram precipitados pelo ajuste de seu pH para 2,0 empregando HCl 6,0 M em solução. Os tubos de centrífuga permaneceram incubados *overnight* em geladeira a 4 °C, finalizando assim o processo de extração dos surfactantes por precipitação ácida. Em seguida, foram novamente centrifugados a 9000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos foram então levados à estufa de secagem onde permaneceram incubados a 45 °C até a formação de material particulado de coloração esbranquiçada em seu interior. Amostras de extratos de surfactantes, assim obtidos, foram submetidas à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier utilizando-se espectrômetro Perkin Elmer® modelo Spectrum One. As amostras foram preparadas por dispersão uniforme do material particulado sobre a superfície de cristais de KBr. O espectro foi gerado entre 500-4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ em atmosfera seca. Os espectros obtidos para as amostras foram comparados aos espectros de surfactina padrão (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) além de espectros de compostos biológicos integrantes da biblioteca espectral Sigma® Biological Sample Library, analisada com o software EZ Omnic® 6.0 do espectrômetro Thermo Nicolet® FT-IR modelo Avatar 320.

3.5.2. Quantificação da surfactina recuperada

A concentração de surfactina presente em 30 mL de efluentes das colunas inoculadas com esporos das culturas puras e mistas dos isolados selecionados foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando cromatógrafo Shimadzu® 10Ai (Osaka, Japan) equipado com detector SPD-10Ai UV-VIS e coluna C18 fase reversa (Merck®, Alemanha). Conforme descrito por Wei e Chu (2002), o sistema foi operado em modo isocrático com o emprego de uma mistura de ácido trifluoracético (TFA) (Sigma®, USA) a 3,8 mM com acetonitrila (Vetec® Química, Rio de Janeiro – RJ) na proporção de 1:4 (v/v) injetada ao fluxo de 1 mL min⁻¹. O volume injetado para cada amostra foi de 10 µL e a absorbância do eluente monitorada em 205 nm. A concentração dos surfactantes foi calculada a partir de curva padrão obtida para a surfactina (Sigma® Chemical Co. St. Louis, MO). Os extratos de surfactantes para análise em CLAE foram obtidos pelo processo de precipitação ácida descrito no item anterior (3.5.1)

3.5.3. Tensões interfaciais *n*-hexadecano / extratos dos surfactantes recuperados dos meios porosos

Tensões interfaciais entre *n*-hexadecano e extratos dos surfactantes recuperados de colunas inoculadas com culturas puras e mistas dos isolados selecionados foram mensuradas em tensiômetro spinning drop Site 100HS (Kruss®, Alemanha). O sistema foi operado em 37 °C e o tubo capilar preenchido com a fase contínua constituída do extrato de surfactantes recuperados. Um volume de 5 µL do hidrocarboneto *n*-hexadecano foi introduzido no capilar com o auxílio de uma seringa e as medidas de tensão interfacial tomadas a 7500 rpm. As imagens das gotas e os valores de tensão interfacial foram analisados com o uso do software de análise do formato de gotas DSA II (Kruss®, Alemanha).

3.5.4. Avaliação do índice de emulsificação inicial (EI) e da estabilidade das emulsões (E24) dos surfactantes recuperados das colunas

O índice de emulsificação inicial (EI) e a estabilidade das emulsões (E24) foram avaliados segundo metodologia adotada por Joshi *et al.* (2008), utilizando-se efluentes das colunas inoculadas com as culturas puras e mistas dos isolados selecionados. Para a obtenção das emulsões, foi misturado a 2 mL dos efluentes mesmo volume de *n*-hexadecano em tubo de vidro com dimensões de 100 mm X 15 mm. O tubo foi vedado com Parafilm® (American National Can TM), agitado vigorosamente por dois minutos, deixado em repouso por igual período de tempo e então tomadas as medidas da altura da emulsão formada. O índice EI foi considerado o volume inicial da emulsão formada. A estabilidade das emulsões foi avaliada 24 horas após o início do ensaio. O volume de emulsão inicial (VE (%)) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VE (\%) = \frac{\text{Altura da emulsão (mm)} \times \text{área da secção transversal (mm)}^2 \times 100}{\text{Volume total (= 4000 mm}^3\text{)}}$$

A estabilidade da emulsão E24 (%), após 24 horas foi quantificada pela fórmula:

$$E24 (\%) = \frac{VE_{24} (\%)}{VE_0 (\%)} \times 100$$

Sendo:

$VE_{24} (\%)$ = Volume de emulsão medida após 24 horas.

$VE_0 (\%)$ = Volume inicial de emulsão formado.

3.6. Recuperação de óleo pesado dos meios porosos inoculados com culturas mistas dos isolados selecionados

As condições de temperatura e meio de cultivo que propiciaram o transporte celular mais efetivo e produção de surfactantes nas colunas foram reproduzidas em meios porosos não-consolidados saturados com o óleo pesado (14,4 °API e densidade $\rho=0,983 \text{ g/cm}^3$ a 25 °C).

Os procedimentos de empacotamento, saturação, esterilização e determinação dos VPs das colunas, descritos no item 3.2.2, foram novamente adotados nessa etapa do experimento. Todo o procedimento foi conduzido em capela de fluxo laminar e tanto o fluido de injeção quanto as colunas, ambos previamente esterilizados, permaneceram em temperatura ambiente. Após a determinação dos VPs das colunas, estas foram novamente saturadas com volume correspondente a 1 VP de tampão PBS. Em seguida, foram pesadas e levadas à capela de exaustão onde o óleo foi injetado a 12 mL h⁻¹, empregando-se tubulação específica para hidrocarbonetos Tygon® Fuel & Lubricant (F-4040-A) Tubing L/S® 13. O óleo foi mantido em banho a 85 °C e as colunas em temperatura ambiente ao longo de sua injeção nas mesmas. A injeção foi mantida até o momento em que a saída de solução PBS nos efluentes das colunas não era mais vista, ou seja, até o momento em que saturação residual de tampão PBS foi alcançada. O volume de óleo retido nas colunas, ou óleo original *in place* (OOIP), correspondeu ao volume de PBS deslocado pelo óleo injetado.

Posteriormente, os meios porosos receberam nova injeção de tampão PBS a 12 mL h⁻¹, simulando a etapa de recuperação secundária do petróleo. O fluxo foi mantido até o momento em que a saída de petróleo das colunas não era mais visível, ou seja, até atingir-se a saturação residual de petróleo nas colunas. O efluente foi coletado em seringas de 50 mL e deixado em repouso para a separação de fases da mistura de óleo em PBS. Finalizada a separação, o volume de PBS recuperado foi registrado e o óleo retido na seringa solubilizado em Thinner®. O petróleo solubilizado no solvente foi transferido para béquer

de vidro com peso pré-determinado. Após completa evaporação do solvente, a quantidade de óleo foi determinada pela diferença entre os pesos do béquer contendo o óleo residual e o peso do béquer vazio. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo do volume de petróleo retido nas colunas. Em seguida, foi iniciada a injeção de 3 VPs das suspensões celulares referentes aos tratamentos 1 a 6 (Tabela 5). As colunas permaneceram incubadas em BOD por 120 horas a 34 °C. Transcorrido o período de incubação, foram levadas a capela de fluxo laminar onde receberam nova injeção de solução PBS até o momento em que a saída de petróleo nos efluentes das colunas não era mais vista. O eluato das colunas foi coletado em provetas de vidro que permaneceram em repouso até completa separação das fases. Em seguida, a fase aquosa foi removida e as paredes da proveta lavadas com Thinner®. Após a evaporação do solvente, a quantidade de óleo recuperada foi calculada volumetricamente. A diferença entre o volume de óleo contido no meio poroso e o volume de óleo recuperado, após a aplicação dos tratamentos e a incubação das colunas em BOD, correspondeu ao volume obtido em resposta à aplicação da recuperação terciária nas colunas saturadas com o petróleo. Os procedimentos executados nessa etapa do experimento seguiram os mencionados por Yakmov *et al.* (2007) e por Batista (2008).

Tabela 5 – Tratamentos de recuperação de petróleo aplicados aos meios porosos não-consolidados saturados com o óleo pesado (14,4 °API)

Colunas	Tratamentos
1	Injeção de suspensões de esporos do isolado LBBMA 4914 + glicose
2	Injeção de suspensões de esporos do isolado LBBMA 4951 + glicose
3	Injeção de esporos das culturas mistas de LBBMA 4914 e LBBMA 4951 + glicose
4	Injeção de esporos das culturas mistas de LBBMA 4914 e LBBMA 4951 + melação*
5	Injeção de água de produção + componentes do meio E + glicose**
6	Injeção de meio E + glicose.

OBS. Os esporos das culturas puras e mistas dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 formaram suspensões em meio mineral E contendo NaCl a 5,0 % (p/v).

Glicose foi adicionada a 2,0 % (p/v) nos tratamentos em que foi utilizada.

* Melação tratado com H₂SO₄ foi adicionado ao meio E a 5,0 % (v/v).

** Água de produção foi usada como solvente para os componentes do meio E.

3.7. Avaliação da colonização microbiana no interior dos meios porosos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com vistas à confirmação do estabelecimento dos isolados selecionados no interior das colunas saturadas com o óleo pesado, fragmentos de areia das mesmas foram removidos e analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para observação em MEV (Leo®, modelo VP 1430), a coluna que apresentou os melhores resultados de recuperação de óleo foi desmontada e porções de areia de sua seção mediana (20 mm) foram cuidadosamente retiradas e avaliadas quanto à presença de bactérias aderidas às partículas.

Fragmentos do meio poroso contendo petróleo foram transferidos para o interior de pequenos frascos cilíndricos constituídos de material plástico perfurado. Inicialmente, foi executada a etapa de fixação em solução de glutaraldeído a 5,0 % (p/v) e tampão PBS a 0,05 mol L⁻¹, na proporção de 1:1, ao longo de 1 hora. Em seguida, foram realizadas seis lavagens de 10 minutos em tampão PBS a 0,05 mol L⁻¹. A etapa de desidratação subsequente constituiu-se de tratamentos seriados em etanol nas graduações de 30°, 50°, 70°, 80°, 95° Gay Lussak-GL por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 minutos em etanol 100° GL. Posteriormente, o material foi transferido para secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer – CPD®, Bal Tec, modelo 30) para desidratação completa. Ao final dessa etapa, partículas de areia foram removidas dos frascos cilíndricos onde estavam acondicionadas e colocadas em suportes em aço inox para a execução de metalização em metalizador Balzers®, modelo FDU 010. A partir de então, foi efetuada a observação no microscópio eletrônico de varredura e as imagens registradas em computador.

3.8. Composição do petróleo recuperado das colunas inoculadas com as culturas mistas dos isolados selecionados

O óleo recuperado foi analisado em termos qualitativos com vistas a detectar possíveis alterações em sua composição de hidrocarbonetos, especialmente os de cadeia média, potencialmente metabolizados pelos microrganismos inoculados ou enriquecidos pela biotransformação de hidrocarbonetos de maior massa molecular, predominantes no óleo pesado. As frações mais leves foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em CG-MS. Perfis cromatográficos obtidos de amostras de óleo recuperado de colunas inoculadas com a cultura mista dos isolados selecionados foram comparados aos perfis de amostras de óleo recuperado de colunas-controle que receberam apenas injeção do meio de cultura. As análises foram conduzidas em cromatógrafo a gás Shimadzu® QP5000 (Osaka, Japan), equipado com sistema de aquisição de dados Class 5000® e coluna capilar Nukol® de 100 m x 0.20 mm i.d. e filme de 0,25 µm (Bellefonte, PA, USA). A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C sendo elevada a 240 °C a taxa de 5 °C min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C sendo empregado gás hélio como fluido carreador ao fluxo de 1,3 mL min⁻¹. As amostras foram diluídas em diclorometano (Sigma®, USA), manualmente injetadas na razão de split correspondente a 69:1 e o espectro de massas registrado na faixa *m/z* de 40 a 500 amu.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção e identificação dos isolados produtores de surfactantes

Os isolados LBBMA 4914 e LBBMA 4951 foram capazes de produzir surfactantes e reduzir as tensões superficiais do meio ME para valores inferiores a 40 mJ m^{-2} . As tensões superficiais foram de $31,4 \text{ mN m}^{-1}$ e $30,2 \text{ mN m}^{-1}$ para os isolados LBBMA 4914 e LBBMA 4951, respectivamente. Os resultados foram obtidos com os isolados crescendo em anaerobiose, a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ e em ME contendo NaCl a 5 % (p/v) e glicose a 2 % (p/v) (Tabela 6). Foram identificados pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) utilizando o sistema Sherlock da Microbial Identification System® (MIDI, Newark, DE, EUA) e a biblioteca de referência ITSA 1.0®. O isolado LBBMA 4914 foi identificado como um membro de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* e LBBMA 4951 como um isolado de *Bacillus subtilis*. Os valores de tensões superficiais obtidos nos demais meios de cultura e condições avaliadas superaram a marca de 40 mJ m^{-2} , descaracterizando os isolados neles inoculados como bons produtores de surfactantes. A tabela 6 apresenta os menores valores de tensão superficial obtidos para todas as condições testadas, ou seja, o isolado inoculado, meio de cultura, fonte de carbono, temperatura e salinidade. De um total de 12 isolados avaliados, três deles não foram capazes de crescer em anaerobiose (LBBMA 4963, LBBMA 4965 e LBBMA 4979; Tabela 6).

Tabela 6 - Tensões superficiais ar-líquido (mJ m^{-2}) obtidas para culturas de isolados de *Bacillus* spp., cultivados em anaerobiose, nos meios minerais ME, M1, M2 e M3 contendo glicose ou sacarose como fontes de carbono a 2,0 % (p/v), nas salinidades de 3, 5, 7 e 8,0 % de NaCl (p/v) e incubados a 34, 37, 45 e 58 °C por 120 horas.

ISOLADO	MEIO	FONTE DE CARBONO	TEMPERATURA (°C)	SALINIDADE (%)	*TENSÃO SUPERFICIAL (mJ m^{-2})
LBBMA 4906	M2	Sacarose	45	3,0	49,2 (0,25)
LBBMA 4914	ME	Glicose	34	5,0	31,4 (0,31)
LBBMA 4915	ME	Glicose	37	3,0	43,2 (0,28)
LBBMA 4951	ME	Glicose	34	5,0	30,2 (0,34)
LBBMA 4964	M1	Sacarose	45	3,0	46,6 (0,41)
LBBMA 4966	M2	Glicose	34	3,0	47,7 (0,23)
LBBMA 4967	ME	Sacarose	37	5,0	46,4 (0,40)
LBBMA 4969	ME	Glicose	34	5,0	42,8 (0,26)
LBBMA 4978	ME	Glicose	34	3,0	44,1 (0,21)

Os valores de tensão superficial listados representam os menores valores obtidos para os isolados inoculados em todos os meios de cultura e em todas as condições testadas.

Isolados em destaque, LBBMA 4914 e LBBMA 4951, foram selecionados como os melhores produtores de surfactantes e usados nos experimentos subseqüentes de transporte, produção de surfactantes e recuperação de óleo pesado em meios porosos não-consolidados.

* Dados de tensão superficial representam a média de duas repetições. Valores entre parênteses referem-se ao desvio-padrão das médias.

Diversos relatos na literatura confirmam a capacidade de crescimento e de produção de surfactantes por isolados de *B. subtilis* inoculados em meio ME em diferentes condições de salinidade e de temperatura. Youssef *et al.* (2007) constataram a produção de surfactantes por isolados de *B. subtilis* RS-1 e isolados de *B. subtilis spizizenii* NRRL B-23049, inoculados em poços produtores de petróleo na forma de cultura mista. Os inóculos foram obtidos a partir do cultivo dos isolados em meio mineral E contendo NaCl a 5,0 % (p/v) a 30 °C. Batista (2008) também reportou a redução da tensão superficial em extratos de surfactantes produzidos por culturas de *B. subtilis* LBBMA 155, crescendo em anaerobiose, a 30 °C e em meio mineral E contendo NaCl a 1,025 % (p/v). Além desse, foi reportado também que isolados de *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram capazes de produzir surfactantes em meio E sob condições de salinidade que variaram de 0 a 2,5 % (p/v) e de temperaturas na faixa de 30 a 35 °C. Fernandes (2007) também observou que os isolados de *Bacillus* LBBMA 111A, LBBMA 155 e LBBMA 283 foram capazes de crescer e produzir biosurfactantes em condição anaeróbia, inoculados meio mineral E contendo glicose ou sacarose a 3,0 % (p/v). Embora trabalhando em aerobiose, Santos (2009) observou que o isolado de *B. subtilis spizizenii* LBBMA 4914, inoculado nos meios minerais ME e M3, não produzia moléculas com atividade tensoativa a 7,0 % (p/v) de NaCl e a 40 °C. A produção de surfactantes com maior atividade tensoativa (35,5 mJ m⁻²) foi registrada por aquele autor com o cultivo do isolado LBBMA 4914 em aerobiose e em meio E contendo sacarose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 2,0 % (p/v).

McInerney *et al.* (2002) atribuíram à peptona proteose, um dos componentes do meio E, o estímulo ao crescimento e à produção de surfactantes por culturas de *Bacillus mojavensis* JF-2, na presença de NaCl a 5,0 % (p/v) e em condição anaeróbia. Algum fator presente na peptona proteose seria responsável pelo crescimento e produção de surfactantes pelo isolado de *B. mojavensis* JF-2 estudado. A natureza bioquímica daquele fator não foi elucidada, embora sua massa molecular média estivesse em torno de 3900 Da, conforme determinado pelos autores. Segundo eles, provavelmente trata-se da carência de algum peptídeo, fundamental ao crescimento e síntese dos surfactantes, cujo suprimento é garantido pela assimilação de peptona proteose. Fernandes (2007), por sua vez, atribuiu à peptona proteose a fonte

de nitrogênio que favoreceu a maior redução da tensão superficial do meio E (35 mJ m^{-2}) inoculado com isolados de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 em anaerobiose. Com relação às fontes de carbono, McInerney *et al.* (2002) avaliaram a capacidade de crescimento e de produção de moléculas tensoativas por isolados de *B. mojavensis* JF-2 crescendo em meio E adicionado de sacarose, frutose ou glicose a 3 % (p/v). Os maiores rendimentos em termos de biomassa foram obtidos com o isolado JF-2 utilizando frutose como fonte de carbono, superando em duas vezes os resultados obtidos para glicose ou sacarose. Rendimentos na produção de surfactantes, no entanto, foram significativamente maiores para glicose, seguidos de frutose e sacarose. Outros estudos também relatam a obtenção de maiores rendimentos na produção de surfactantes em meios de cultura suplementados com glicose e inoculados em aerobiose com isolados de *B. subtilis* (Joshi *et al.*, 2008). Esses pesquisadores observaram que isolados de *B. subtilis* 20B foram capazes de crescer em 14 fontes de carbono diferentes, dentre fontes hidrossolúveis e lipossolúveis, embora a produção de surfactantes somente foi detectada nos meios suplementados com fontes hidrossolúveis, com destaque para a glicose adicionada ao meio de cultura a 2% (p/v). Além desses, Mukherjee & Das (2005) constataram que fontes hidrossolúveis, a exemplo de glicose, propiciaram maior produção de surfactantes por diferentes isolados de *B. subtilis* em condições laboratoriais, ao contrário de fontes hidrofóbicas, a exemplo de óleos vegetais e hidrocarbonetos, que mostraram-se inibitórias à produção de moléculas tensoativas pelos microrganismos avaliados.

4.2. Transporte dos isolados de *B. subtilis* LBBMA 4914 e LBBMA 4951 em meios porosos não-consolidados

Isolados de *B. subtilis* *espizizenii* LBBMA 4914 foram inicialmente transportados na forma de células vegetativas, suspensas em tampão PBS e nas concentrações de $3,7 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$; $3,5 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ e $3,2 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ (Figura 1-A). Os esporos desses isolados foram também transportados nos meios porosos não-consolidados, embora nas concentrações iniciais de $4,1 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$; $4,3 \times 10^6$

UFC mL⁻¹ e $4,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ (Figura 1-B). Em ambos os casos, tanto na forma de células vegetativas quanto na forma de esporos, os melhores resultados de eficiência de transporte, traduzidos pelos valores de C/C_0 , foram obtidos com a injeção das suspensões celulares (C_0) na faixa de 10^5 UFC mL⁻¹ (Figura 1; A e B). Os resultados obtidos com as suspensões a 10^6 UFC mL⁻¹ aproximaram-se bastante daqueles obtidos com as suspensões a 10^5 UFC mL⁻¹, distanciando-se dos encontrados para as suspensões na faixa de 10^7 UFC mL⁻¹, especialmente nos tratamentos em que foram injetados esporos (Figura 1; A e B). Comportamento semelhante foi observado para os isolados de *B. subtilis* LBBMA 4951, injetados em suspensões de células vegetativas a $3,4 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, $3,6 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $3,1 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, e em suspensões de esporos a $4,2 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, $4,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $4,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, cujos resultados de eficiência de transporte nos meios porosos foram melhores para as concentrações celulares na faixa de 10^5 UFC mL⁻¹ e 10^6 UFC mL⁻¹. A menor eficiência de transporte, verificada para as suspensões celulares na faixa de 10^7 UFC mL⁻¹, para ambos os isolados, pode estar relacionada a um dos principais mecanismos que causam retenção celular em sistemas porosos, ou seja, entupimentos provocados por suspensões injetadas em elevadas concentrações. Segundo Sarkar *et al.* (1994), a ocorrência de entupimentos em meios porosos são mais freqüentes com a injeção de suspensões celulares concentradas, na ordem de $5,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, sendo um fator de grande relevância em estudos de transporte celular em meios porosos. Inoculação de isolados de *B. subtilis* em fragmentos de arenito Botucatu, em suspensões celulares a $9,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, provocaram entupimentos nas seções iniciais do arenito inviabilizando a efetivação da recuperação de petróleo daqueles sistemas. Tal efeito foi atribuído à alta concentração de células nele injetadas (Abram, 2000).

A injeção dos isolados de *B. subtilis* na forma de esporos, tanto LBBMA 4914 quanto LBBMA 4951, propiciou melhores resultados de eficiência de transporte quando comparados aos resultados obtidos com os isolados injetados como células vegetativas (Figura 1; A, B, C e D). A análise da recuperação celular dos dois isolados de *B. subtilis*, injetados em suspensões de esporos, aponta para resultados de recuperação que superaram em até duas vezes os resultados obtidos quando injetados na

forma de células vegetativas (Figura 1; A e B, C e D). Esses resultados indicam o transporte na forma de esporos como a melhor opção para a injeção das suspensões dos isolados de *B. subtilis* selecionados nos meios porosos não-consolidados e nas condições experimentais testadas. São resultados condizentes com os encontrados por Nascimento (2004), cujos ensaios de avaliação da eficiência de transporte de *B. subtilis* LBBMA 155, em meios porosos não-consolidados, também apontaram para valores de C/C_0 maiores com a injeção das células na forma de esporos. Jang *et al.* (1983) também reportaram em seus trabalhos que esporos de isolados de *Bacillus* spp. são melhor transportados em cores de arenito tipo Berea que os mesmos na forma de células vegetativas. Segundo esses autores, o pequeno tamanho dos esporos seria o fator preponderante que favoreceria seu transporte ao longo daqueles sistemas. McInerney *et al.* (2002) também concluíram que esporos de *B. mojavensis* JF-2 são melhor transportados que células vegetativas e que operações sucessivas de injeção, recuperação e re-injeção daqueles esporos nos meios porosos podem favorecer a seleção de esporos com habilidades de transporte melhoradas. Outra observação importante é que variações mais pronunciadas nos padrões de alteração de C/C_0 , ao longo dos experimentos de transporte, foram verificadas nas colunas que receberam injeção de suspensões de células vegetativas, comparativamente às colunas que receberam a injeção de suspensões de esporos, para ambos os isolados avaliados (Figura 1; A e B, C e D). Para as suspensões de células vegetativas do isolado LBBMA 4914 injetadas a 10^6 UFC mL⁻¹, por exemplo, foram verificadas variações na eficiência de transporte entre 0,08 e 0,25 (Figura 1-A). Para os isolados de LBBMA 4951, injetados em suspensões de células vegetativas a 10^5 UFC mL⁻¹, foram verificados valores de eficiência de transporte variando entre 0,29 e 0,45 (Figura 1-C). Para o caso dos isolados transportados em suspensões de esporos, os valores de gráficos de eficiência de transporte obtidos apresentaram menor variação ao longo dos experimentos de transporte (Figura 1; B e D). Esse fato indica que esporos injetados e, subseqüentemente aderidos, causam menor interferência na adesão de esporos injetados posteriormente. Nascimento (2004) observou fato semelhante, cujos perfis dos gráficos de transporte de esporos de *B.*

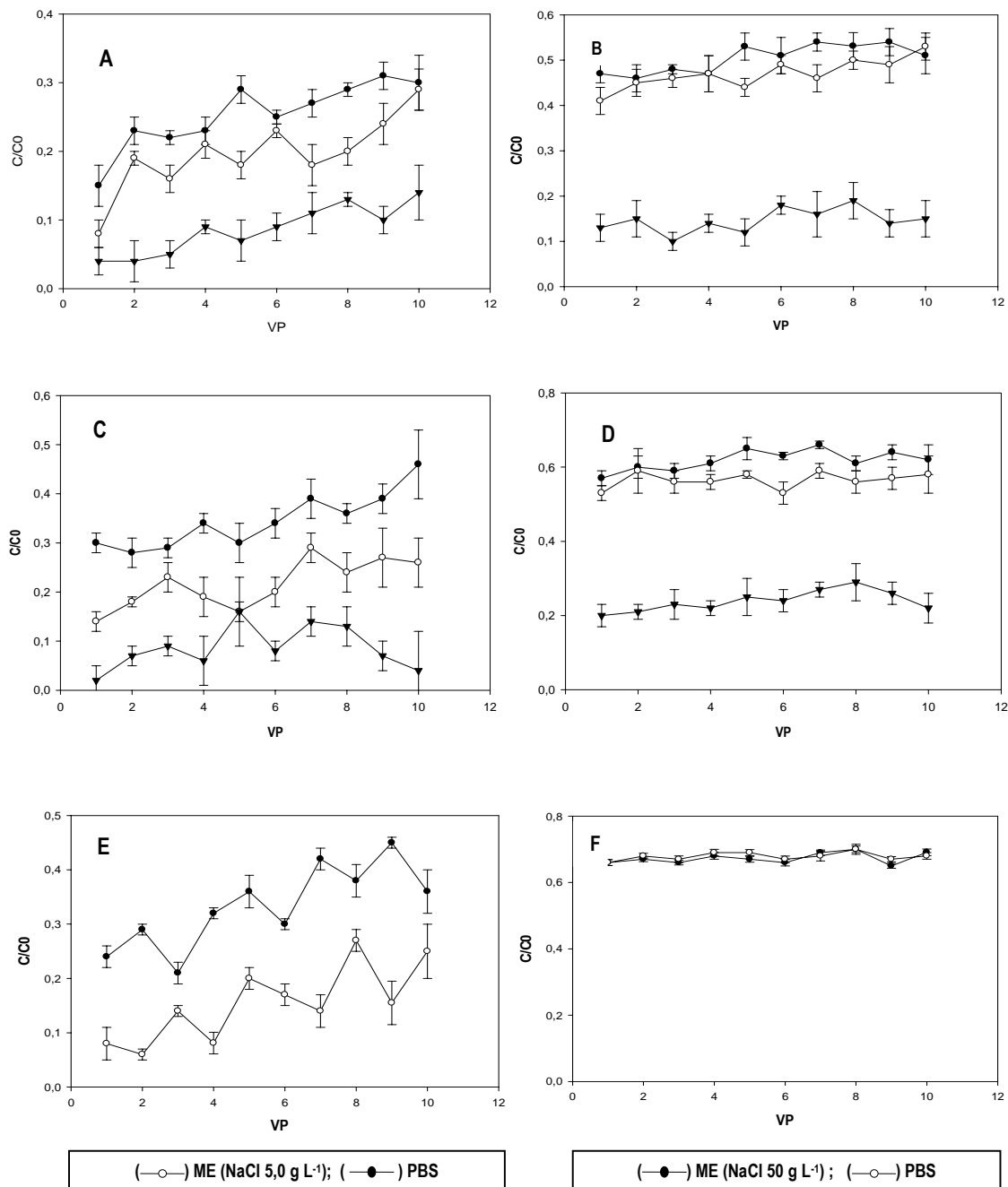


Figura 1. Eficiência de transporte apresentada como a relação C/C_0 em função da aplicação de volumes porosos (VP) de suspensões de isolados de LBBMA 4914 em PBS, na forma de células vegetativas (A) e de esporos (B). Gráficos C e D referem-se às eficiências de transporte de isolados de LBBMA 4951, transportados na forma de células vegetativas e na forma de esporos, respectivamente. Gráficos E e F relacionam C/C_0 x VP para culturas mistas de LBBMA 4914 e LBBMA 4951 injetadas, respectivamente, na forma de células vegetativas e de esporos, em tampão PBS ou em meio mineral E contendo NaCl a 5,0 % (p/v) e glicose a 2% (p/v) a 10^6 UFC mL⁻¹. Para A, B, C e D: $C_0 \sim 10^5$ UFC mL⁻¹ (●); $C_0 \sim 10^6$ UFC mL⁻¹ (○) e $C_0 \sim 10^7$ UFC mL⁻¹ (▼).

subtilis LBBMA 155 em meios porosos não-consolidados são similares aos perfis obtidos para os isolados de LBBMA 4914 e LBBMA 4951.

Os perfis de transporte obtidos para os isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951, injetados na forma de células vegetativas ou na forma de esporos, também apresentam diferenças significativas ao serem comparados entre si (Tabela 1; A e C, B e D). Houve incrementos na eficiência de transporte dos isolados de LBBMA 4951 quando suas células vegetativas em suspensão foram injetadas a $3,4 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, sobretudo após a injeção do 3° VP, cujos resultados de C/C_0 coincidiram ou superaram a marca de 0,3 (Tabela 1-C). Embora transportados nas mesmas condições experimentais e em concentrações aproximadas, ou seja, a $3,7 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, isolados de *B. subtilis spizizeni* LBBMA 4914 apresentaram valores de eficiência de transporte abaixo da marca de 0,3 (Tabela 1-A). Essas variações poderiam estar relacionadas a diferenças na natureza das próprias células, a exemplo de diferenças de hidrofobicidade de seus envoltórios, as quais exerceriam maior influência nos experimentos de transporte em concentrações celulares mais baixas, a 10^5 UFC mL⁻¹, por exemplo. Segundo alguns autores, quanto maior a hidrofobicidade dos envoltórios celulares maior a sorção de células às superfícies das partículas constituintes do meio poroso, sendo a retenção celular mais fortemente influenciada por esse fator que diferenças de cargas elétricas entre as células e as partículas do sistema (Crawford, 1996). Os isolados de LBBMA 4914 e LBBMA 4951, injetados na forma de células vegetativas a 10^6 UFC mL⁻¹ apresentaram, similarmente, variações de eficiência de transporte girando em torno de 0,2 ao longo dos experimentos. Comportamento semelhante foi verificado para as suspensões de células a 10^7 UFC mL⁻¹, em que os valores de C/C_0 obtidos oscilaram em torno de 0,1 para ambos os isolados transportados.

A avaliação da hidrofobicidade dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 mostrou variações que possivelmente se relacionem aos valores máximos de eficiência de transporte dos isolados injetados a 10^5 UFC mL⁻¹ e na forma de células vegetativas, ou seja, isolados de LBBMA 4914 apresentaram maior hidrofobicidade e por isso maior retenção celular que isolados de LBBMA 4951 (Figura 2).

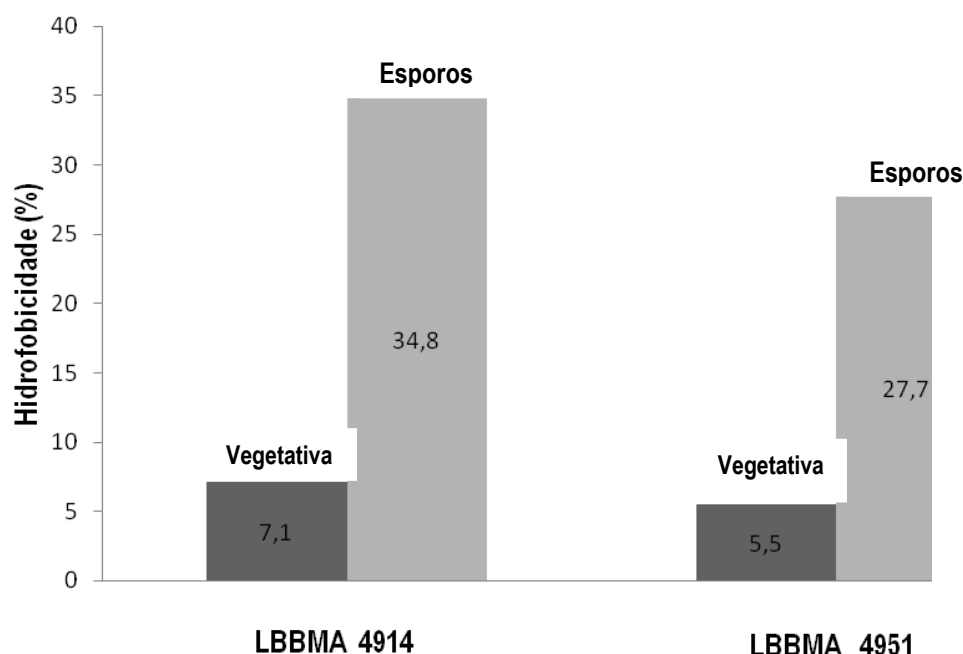


Figura 2. Valores percentuais de hidrofobicidade dos envoltórios dos isolados de *B. subtilis* LBBMA 4914 e LBBMA 4951, na forma de esporos e na forma de células vegetativas, cultivados em meio mineral E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v) e incubados a 30 °C.

Comparando-se os perfis de transporte obtidos para os dois isolados de *B. subtilis* selecionados, transportados na forma de esporos e em quaisquer concentrações celulares, observa-se que os isolados de LBBMA 4951 também apresentaram resultados de transporte superiores aos apresentados pelos isolados de LBBMA 4914, mesmo que em menor proporção ao que foi verificado para as células vegetativas (Figura 1, C e D). Com isso, da mesma forma que para as células vegetativas, esse fato pode estar relacionado às diferenças de hidrofobicidades verificadas entre os envoltórios que constituem os esporos característicos dos dois isolados, ou seja, a maior hidrofobicidade verificada para os esporos dos isolados de LBBMA 4951 estaria relacionada aos menores valores de eficiência de transporte obtidos para aquele isolado.

Com base nos resultados obtidos, o transporte da suspensão de esporos na faixa de 10^6 UFC mL⁻¹ foi a estratégia considerada mais adequada e selecionada para os experimentos subsequentes de

transporte dos isolados nos meios porosos não-consolidados. Essa escolha baseou-se nos maiores valores de eficiência de transporte obtidos para as células injetadas na forma de esporos e no maior volume celular passível de injeção, sem prejuízos ao deslocamento das células ao longo dos meios porosos. Vale ressaltar ainda que em todos os ensaios e em todas as condições testadas não foi detectada, por meio de observações visuais, a formação de agregados celulares característicos da ocorrência de fenômenos de *auto-agregação*, tanto para os isolados de LBBMA 4914 quanto para os isolados de LBBMA 4951.

Ao se avaliar a eficiência de transporte quando os isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 foram transportados em cultura mista, na forma de células vegetativas a $3,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e na forma de esporos a $4,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, suspensos em meio E ou em solução PBS, constatou-se novamente que os esporos traduzem melhores resultados de recuperação que as células vegetativas da cultura mista dos isolados de *B. subtilis* (Figura 1, E e F). Em ambas as situações, sejam inoculados em tampão PBS ou em meio E, os esporos em cultura mista apresentaram valores de C/C_0 que superaram a marca de 0,6. Para as células vegetativas, entretanto, sua eficiência de transporte em cultura mista atingiu valor máximo de 0,4, mesmo assim quando transportadas em solução PBS e em poucos momentos (Figura 1, E e F).

Observa-se também maior influência da natureza do fluido carreador das células, seja PBS ou meio mineral E, sobre a eficiência de transporte dos isolados em cultura mista na forma de células vegetativas. Quando transportadas em PBS, os valores de C/C_0 variaram entre 0,2 e 0,4, ao passo que ao serem transportadas em meio E os valores de eficiência de transporte das células vegetativas não ultrapassaram a marca de 0,2 (Figura 1-E). A influência da alta força iônica da suspensão em meio E, contendo NaCl a 5,0% (p/v), pode ter levado a uma maior retenção celular e, com isso, menor eficiência de transporte para as culturas mistas de *B. subtilis* injetadas. Fontes *et al.* (1991) e Desphande e Shonard (2000) atribuíram às altas forças iônicas das soluções carreadoras de isolados bacterianos aumentos significativos de retenção celular observados em experimentos de transporte em colunas empacotadas com areia. Bossolan (2000) preconiza que aumentos na força iônica potencializam a habilidade das

bactérias em aderirem a substratos pelo aumento de íons em solução, os quais formariam pontes entre sítios carregados tanto nas superfícies dos grãos de areia quanto nas superfícies celulares. Além disso, altas forças iônicas também favoreceriam agregações celulares levando a aumentos na obstrução dos poros do meio poroso, o que culminaria com incrementos na retenção celular. Para as culturas mistas transportadas na forma de esporos, por sua vez, não foram verificadas diferenças significativas em relação a eficiência de transporte ao serem carreados em PBS ou em meio mineral E. Com isso, o meio E foi escolhido o fluido carreador dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951, já que a injeção da cultura mista injetada na forma de esporos apresentou os melhores resultados de eficiência de transporte ao longo dos meios porosos não-consolidados. Além disso, em determinado momento, seria indispensável a injeção de meio E, já que responde pela indução da germinação dos esporos injetados além de promover o estímulo à produção de surfactantes por parte dos isolados de *B. subtilis* inoculados nos meios porosos.

Considerando os resultados obtidos e o que foi exposto, ficou estabelecido então que os ensaios de transporte celular em meios porosos não-consolidados, visando à produção de surfactantes e à recuperação de óleo pesado contido naqueles meios, seriam conduzidos com os isolados na forma de esporos, em culturas mistas e suspensos em meio E contendo NaCl a 5,0 % (p/v) e glicose a 2 % (p/v).

Abaixo (Figura 3), ilustração dos resultados dos procedimentos adotados para a obtenção de esporos do isolado LBBMA 4951, a partir de células vegetativas inicialmente cultivadas em caldo-nutriente e posteriormente em meio esporogênico em placas de petri. É visível o predomínio de esporos corados com o corante verde-malaquita. As lâminas foram preparadas a partir de esfregaços obtidos de suspensões aquosas preparadas com material retirado da superfície do meio sólido esporogênico contido nas placas de petri.

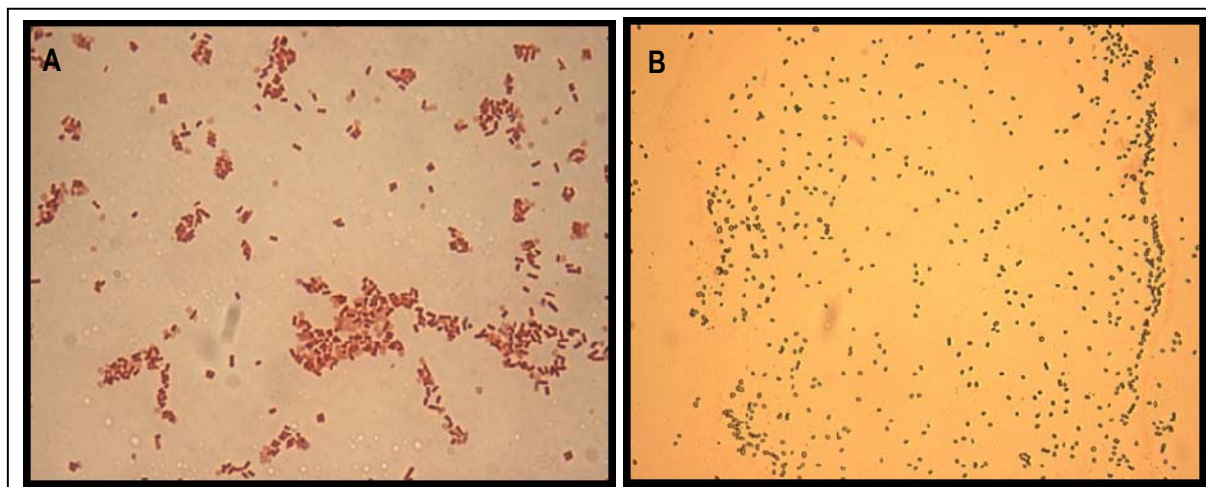


Figura 3. Células vegetativas (A) de LBBMA 4951 cultivadas em caldo nutriente e coradas com safranina. Esporos (B) de isolados de LBBMA 4951 corados com verde-malaquita, obtidos de meio sólido indutor de esporulação contido em placas de petri incubadas em BOD a 37 °C por 72 h. As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz polarizada com aumentos de 400X. Detalhes sobre o procedimento no item 4.3.

4.3. Detecção e avaliação da natureza dos surfactantes recuperados dos sistemas porosos

A produção de surfactantes nos meios porosos não-consolidados pelos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951, inoculados na forma de esporos em suspensões do meio E, foi confirmada com base nos valores de tensão superficial obtidos de amostras de efluentes recuperados dos meios porosos inoculados. Os valores médios de tensão superficial foram de 30,2 mN m⁻¹ e 29,3 mN m⁻¹ para os isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951, respectivamente. Efluentes da coluna-controle não inoculada apresentaram valores médios de tensão superficial próximos a 60,0 mJ m⁻². A partir dos mesmos efluentes das colunas que apresentaram redução da tensão superficial (30,2 mN m⁻¹ e 29,3 mJ m⁻²), foram obtidos extratos dos surfactantes que foram posteriormente avaliados em espectrômetro de infra-vermelho com transformada de Fourier. Os espectros no FT-IV em KBr das amostras analisadas mostraram-se muito semelhantes àquele obtido para a surfactina padrão (Sigma®, USA) (Figura 4), assim como a perfis de espectros da surfactina apresentados por outros autores, a exemplo de Joshi *et al.* (2008).

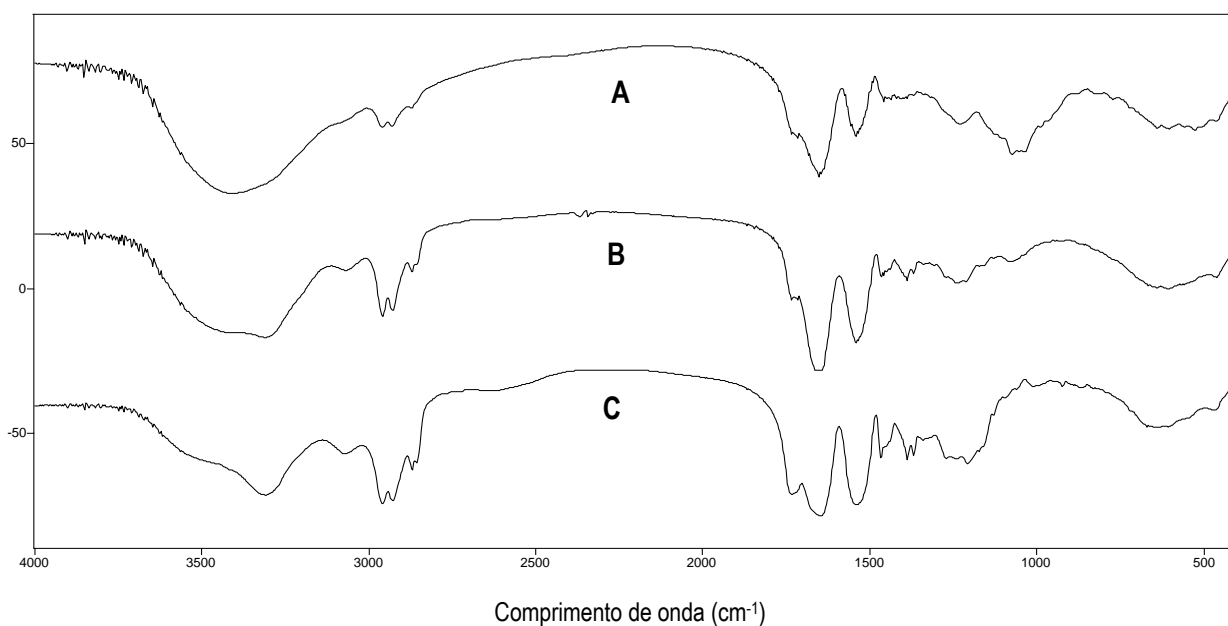


Figura 4 - Espectros no IR de amostras de surfactantes recuperados de efluentes de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914 (A) e de LBBMA 4951 (B). Em (C) espectro gerado pela surfactina padrão (Sigma®, USA).

Os espectros no IR, obtidos das culturas dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951, foram ainda comparados com espectros de compostos biológicos integrantes da biblioteca de referência Sigma® Biological Library (Figura 5). Embora surfactina não esteja presente dentre os perfis espectrais daquela biblioteca, foi encontrado um composto, denominado gramicidina de *B. brevis*, que apresentou maior índice de similaridade e perfil bastante semelhante àqueles obtidos para os surfactantes produzidos pelos dois isolados de *B. subtilis* avaliados. O composto gramicidina de *B. brevis* é relatado na literatura como um antibiótico de natureza lipopeptídica (Sawyer *et al.*, 1990) confirmando, mais uma vez, tratar-se do surfactante surfactina.

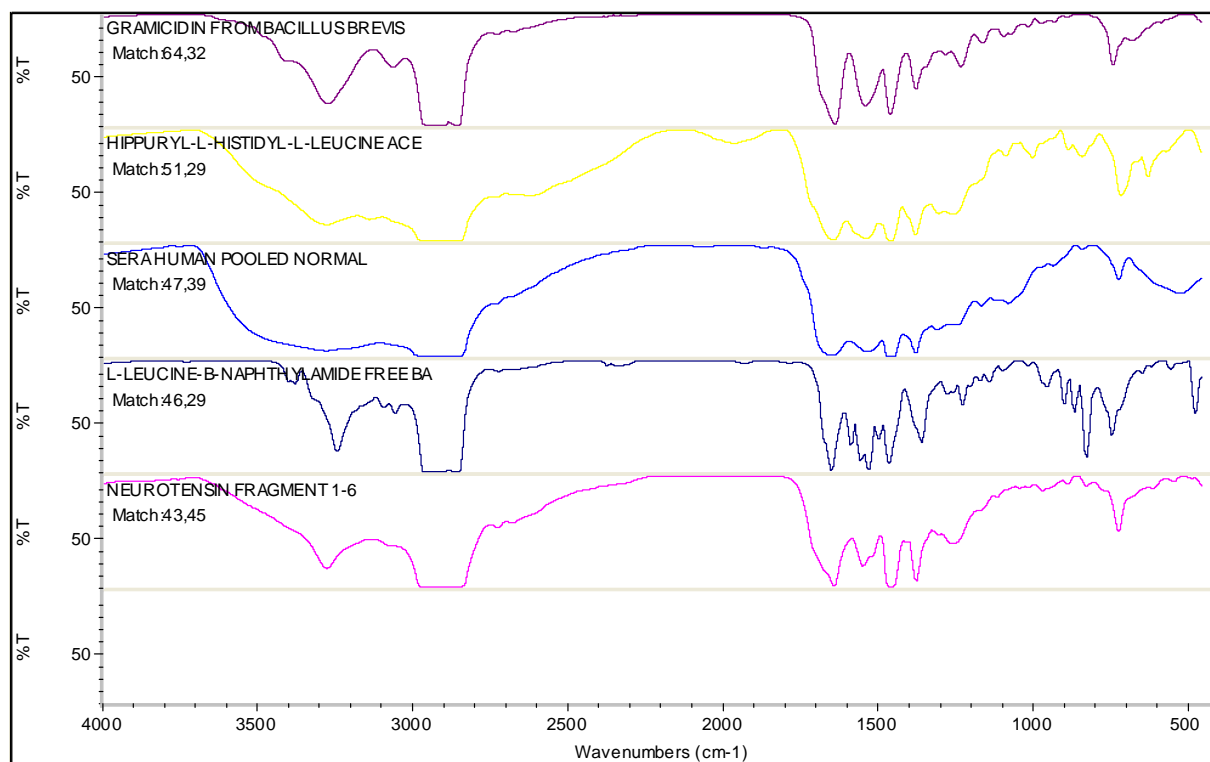


Figura 5 - Espectros no IR da biblioteca de compostos biológicos Sigma® Biological Library, listados como os prováveis compostos produzidos pelos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951. O espectro de gramicidina de *B. brevis* (Match 64,32) apresentou maior similaridade com os espectros gerados pelos surfactantes produzidos pelos isolados de *B. subtilis* LBBMA 4914 e LBBMA 4951.

4.4. Quantificação da surfactina recuperada de colunas inoculadas com os isolados de *B. subtilis* selecionados

Análises por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE) de extratos de surfactantes, provenientes de efluentes de meios porosos inoculados com isolados de LBBMA 4914, LBBMA 4951 e com as culturas mistas dos dois isolados, demonstraram a presença de surfactina nas concentrações médias de 23,9 mgL⁻¹, 29,5 mgL⁻¹ e 26,9 mgL⁻¹, respectivamente. Esses valores são estatisticamente diferentes pelo teste F a 5,0 % de probabilidade e foram obtidos pela soma das áreas dos picos característicos das isoformas que constituem a surfactina. Segundo Youssef *et al.* (2007), surfactantes lipopeptídeos em concentrações equivalentes a 10 mgL⁻¹ já promovem a mobilização de óleo em núcleos porosos tipo *Berea*. Os mesmos autores detectaram surfactantes lipopeptídeos a 90 mgL⁻¹ em efluentes de poços de petróleo inoculados com culturas mistas de isolados de *B. subtilis*. Yakmov *et al.* (1997) obtiveram surfactantes a 50 mgL⁻¹ nos sobrenadantes de culturas de *B. licheniformis* crescendo em

anaerobiose, a 50 °C e em meio mineral contendo NaCl a 7,0% (p/v) e glicose a 2,0% (p/v) empregando, entretanto, cultivos em batelada. A concentração verificada para as colunas inoculadas com a cultura mista dos dois isolados, da mesma forma que verificado nos ensaios de DMC, ocupou posição intermediária entre os valores obtidos para as colunas inoculadas com as culturas puras dos isolados de *B. subtilis*. Esse fato pode estar relacionado à competição entre os dois isolados pelos nutrientes do meio E quando em cultura mista, já que isolados de LBBMA 4951 produziram em cultura pura surfactina em maior concentração que a verificada para a cultura mista.

A figura 12 ilustra os perfis cromatográficos obtidos para a surfactina recuperada de efluentes de colunas inoculadas com os isolados em cultura pura e em cultura mista. Os picos cromatográficos correspondentes aos tempos de retenção de 15, 20, 22, 23, 26 e 27 minutos, aproximadamente, correspondem às seis isoformas características da surfactina, identificadas com base nos picos obtidos para a surfactina padrão (Sigma® USA).

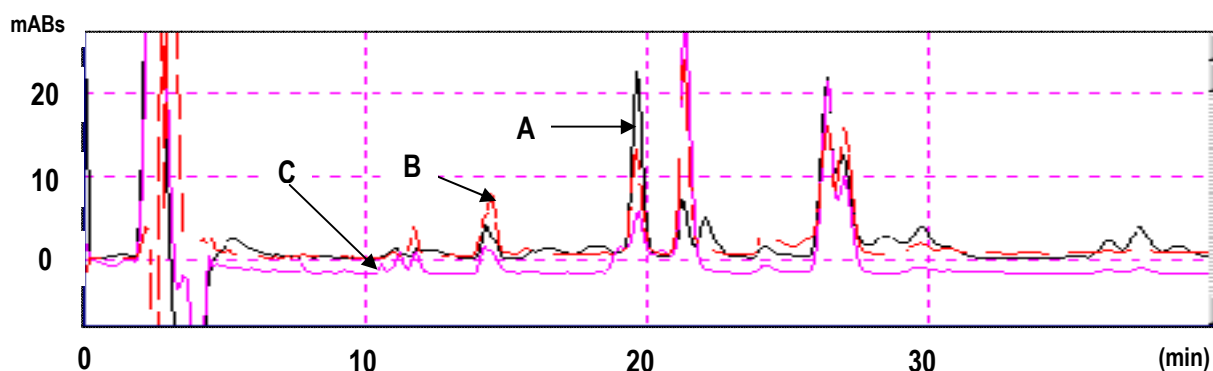


Figura 12. Perfis cromatográficos do surfactante surfactina recuperada de efluentes de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914 (A), LBBMA 4951 (B) e cultura mista dos dois isolados (C). Os cromatogramas ilustram os resultados obtidos para uma dentre as três repetições avaliadas para cada caso.

4.5. Produção de ácidos orgânicos e de 2,3 – butanodiol pelos isolados de *Bacillus* inoculados nos sistemas porosos

A presença de ácidos orgânicos e do álcool 2,3-butanodiol foi detectada em todos os efluentes das colunas analisadas, tanto naquelas inoculadas com as culturas puras quanto nas colunas inoculadas com a cultura mista dos isolados de *B. subtilis* selecionados. Dentre os ácidos orgânicos detectados destaca-se o acetato, que superou os níveis encontrados para lactato ou succinato em todos os efluentes das colunas avaliadas (Figura 10; A, B e C). Lactato, ocupando níveis intermediários, também foi verificado nos efluentes de todas as colunas analisadas, estando à frente do succinato que respondeu pelos menores níveis de ácidos orgânicos detectados (Figura 10; A, B e C). Efluentes da coluna inoculada com os isolados de LBBMA 4914 apresentaram os maiores níveis tanto de acetato quanto de lactato, comparando-os com os níveis verificados para os efluentes das colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4951 e com a cultura mista dos dois isolados (Figura 10; A, B e C). Produção de acetato e lactato por *B. subtilis*, cultivados em anaerobiose e em meio mineral E, foi reportada por Fernandes (2007) que, além disso, observou também que alterações na concentração de agentes redutores presentes no meio não promoviam mudanças na concentração de ácidos orgânicos produzidos. McInerney *et al.* (2002), analisando efluentes de cores tipo Berea inoculados com *B. mojavensis* JF-2, também detectaram pequenas quantidades de lactato, acetato e butirato, produzidos por aqueles isolados no interior dos meios porosos. Segundo esses autores, a produção de ácidos orgânicos pode ser útil em processos de MEOR, principalmente em jazidas contendo formações carbonáceas, já que os ácidos podem promover a degradação da matriz calcárea que constitui aquelas formações, aumentando o tamanho de seus poros e facilitando a mobilidade do óleo aprisionado (Jack, 1988; McInerney *et al.*, 2005).

A produção do álcool 2,3-butanodiol também foi detectada nos efluentes de todas as colunas inoculadas com os isolados de *B. subtilis* selecionados nesse trabalho. Baseando-se nos valores das áreas dos picos cromatográficos obtidos para os dois isômeros de 2,3-butanodiol, ficou evidenciado que a

produção do álcool por LBBMA 4951 foi pouco maior que a produção detectada nos efluentes da coluna inoculada com isolados de LBBMA 4914 e com a coluna inoculada com a cultura mista dos dois isolados, que apresentaram níveis aproximados daquele álcool (Figura 10, A, B e C). O álcool 2,3-butanodiol também seria útil em MEOR já que evitaria a formação de cristais líquidos de surfactantes além de atuar como um *co*-surfactante, aumentando a eficiência dos surfactantes presentes (Maudgalya, 2005). Segundo Nakano *et al.* (1997), o álcool 2,3-butanodiol é um produto frequentemente produzido por espécies de *Bacillus* durante o processo fermentativo, estando seu papel microbiano ainda não muito bem elucidado. Batista (2008) observou melhores resultados de recuperação de óleo pesado, injetado em meios porosos não-consolidados, a partir da inoculação de extratos de surfactantes de culturas de *B. subtilis* LBBMA 155 adicionados de 2,3-butanodiol a 0,01 M. Youssef *et al.* (2007) também confirmaram a produção de acetato, lactato e 2,3-butanodiol em efluentes de poços de petróleo inoculados com culturas mistas de isolados de *B. subtilis* RS-1 e isolados de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049. Além desses, Yakimov *et al.* (1997) detectaram a produção de acetato e de 2,3-butanodiol em efluentes de *cores* inoculados com *B. licheniformis* BNP29 e incubados a 30 °C, cujas concentrações de ácido e de álcool foram similares às verificadas para aqueles isolados cultivados em regime de batelada.

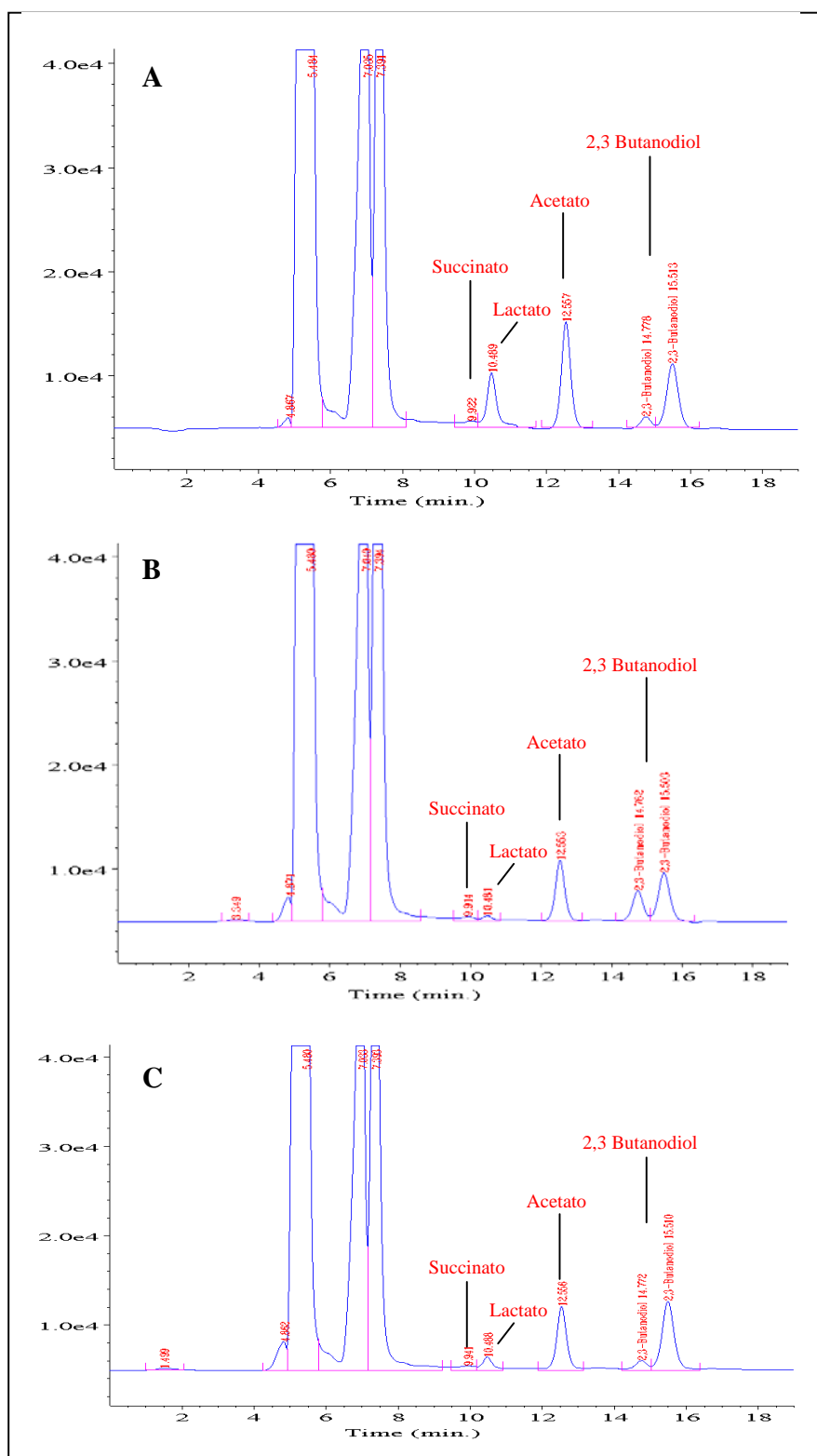


Figura 10. Ácidos orgânicos (*succinato*, *acetato* e *lactato*) e 2,3 butanodiol detectados por CLAE em efluentes de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914 (A), LBBMA 4951 (B) e com culturas mistas dos dois isolados (C).

4.6. Tensão interfacial *n*-hexadecano/extratos de surfactantes de efluentes das colunas inoculadas com os isolados de *B. subtilis*

Amostras de extratos de surfactantes, obtidos de efluentes de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914, isolados de LBBMA 4951 e com culturas mistas dos dois isolados, foram avaliadas quanto aos valores de tensão interfacial contra *n*-hexadecano em tensiômetro spinning-drop. Extratos de surfactantes recuperados de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914 apresentaram tensão interfacial média de 4,29 mN m⁻¹, valores superiores aos obtidos para os extratos de surfactantes recuperados de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4951, que ficaram em torno de 3,51 mN m⁻¹. Os extratos da cultura mista mostraram resultados de tensão ainda menores, ou seja, 2,5 mN m⁻¹ em média (Figura 6). Os extratos obtidos de efluentes de colunas-controle, que não receberam inoculação dos isolados de *B. subtilis*, apresentaram valores médios de tensão interfacial próximos de 27,0 mN m⁻¹. Os resultados de tensão interfacial obtidos são estatisticamente diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os valores de tensão interfacial, obtidos para os extratos de surfactantes produzidos pelos isolados de *B. subtilis* selecionados, atingiram valores pouco menores que os encontrados na literatura em condições experimentais semelhantes. Joshi *et al.* (2008) avaliaram a tensão interfacial contra *n*-hexadecano de extratos de surfactantes, obtidos de isolados de *B. subtilis* 20B cultivados em meio mineral contendo glicose a 2% (p/v), encontrando valores médios em torno de 4,5 mN m⁻¹. McInerney *et al.* (2002) obtiveram valores de tensões interfaciais de extratos de surfactantes, produzidos por *B. subtilis spizizenii* cultivados em meio mineral E contendo NaCl a 5,0 % (p/v), contra tolueno próximos a 5,7 mN m⁻¹. Os resultados conseguidos com a cultura mista são condizentes com vários relatos na literatura que comprovam maior efetividade na redução de tensões interfaciais quando surfactantes atuam em mistura, em detrimento de sua ação individual (McInerney *et al.* 2004b, Fuangswasdi *et al.*, 2006; Youssef 2007b).

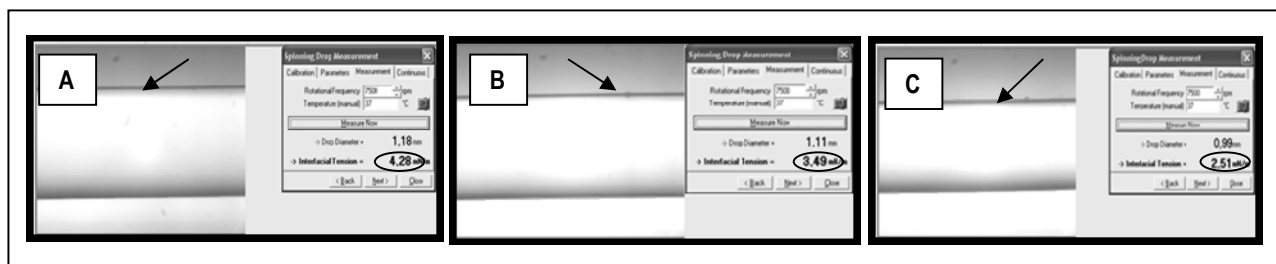


Figura 6 - Ilustração das gotas (setas) de *n*-hexadecano suspensas nos extratos de surfactantes recuperados, obtidas em tensiômetro spinning-drop com capilar mantido a 7500 rpm empregando o software DSA®. Os valores 4,28, 3,49 e 2,51 mN m⁻² (círculos) referem-se às tensões interfaciais dos extratos de surfactantes, recuperados de efluentes de colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914 (A), LBBMA 4951 (B) e com a cultura mista dos dois isolados (C), contra *n*-hexadecano.

4.7. Índice de emulsificação inicial (EI) e estabilidade das emulsões (E24) dos surfactantes recuperados de colunas inoculadas com os isolados selecionados

Os surfactantes recuperados das colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4951 propiciaram o maior valor de emulsificação inicial (EI) (70%) dentre os valores encontrados para os demais casos, ou seja, para os surfactantes recuperados de colunas inoculadas com LBBMA 4914 e surfactantes recuperados de colunas inoculadas com culturas mistas dos dois isolados. Os surfactantes produzidos nos meios porosos por LBBMA 4951 e pela cultura mista dos dois isolados de *B. subtilis* propiciaram valores de emulsificação inicial de 53% e 43%, respectivamente. Observou-se ainda que em todos os três casos analisados houve a formação de emulsões estáveis com *n*-hexadecano após 24 horas (E24), uma vez que seus volumes, 24 horas após sua formação, correspondiam a 50% ou mais de seu volume original (Figura 7) (Willumsen e Karlson, 1979). A cultura mista apresentou os melhores resultados de E24, demonstrando elevada capacidade de emulsificação (79%), seguida dos isolados de LBBMA 4914 (69%) e de LBBMA 4951 (59%).

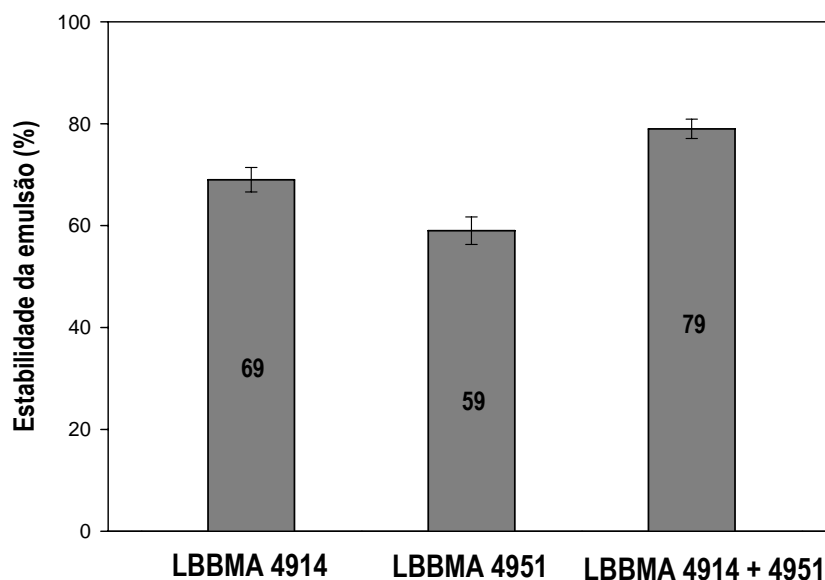


Figura 7. Capacidade emulsificante de extratos de surfactantes recuperados de efluentes de meios porosos não-consolidados inoculados com isolados de LBBMA 4914, LBBMA 4951 e da cultura mista dos dois isolados, LBBMA 4914 + LBBMA 4951.

Joshi *et al.* (2008) obtiveram (80%) de E24 entre surfactantes produzidos por isolados de *B. subtilis* 20B e *n*-hexadecano, porém, cultivando os microrganismos em aerobiose. Fernandes (2007) avaliou a estabilidade de emulsões de surfactantes, produzidos por isolados de *B. subtilis* cultivados em meio mineral E, emulsificados em querosene e obteve valores de E24 variando entre 72,5% e 82,2%, embora trabalhando com o meio mineral sem adição de NaCl. Lima (2008) também avaliou a estabilidade de emulsões, formadas entre querosene e surfactantes produzidos por *B. subtilis* LBBMA 155, obtendo valores na faixa de 74%, apesar de conduzir seus experimentos em meio líquido, em aerobiose e em condições otimizadas de rendimento e de atividade dos surfactantes.

4.8. Diluição micelar crítica (DMC) de extratos de surfactantes obtidos de efluentes de colunas inoculadas com os isolados selecionados

Os valores de DMC dos extratos de surfactantes avaliados, recuperados dos efluentes das colunas inoculadas com isolados de LBBMA 4914, LBBMA 4951 e com culturas mistas dos dois isolados, correspondem ao ponto de intersecção entre duas retas, construídas a partir da regressão linear dos pontos obtidos nos gráficos que relacionam tensão superficial *versus* concentração (%) dos extratos de surfactantes analisados (Figura 8). Para extratos provenientes dos isolados de LBBMA 4914 foi obtido um valor de DMC próximo de 5. Isso equivale dizer que a concentração dos surfactantes presentes naquelas amostras era de 5 vezes a sua concentração micelar crítica, ou ainda, que aquele extrato poderia ser diluído 5 vezes sem que o valor de sua tensão superficial sofresse alterações significativas. Batista (2008) relata que a DMC de extratos de surfactantes de *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258, cultivados a 34 °C, em anaerobiose e em meio mineral E contendo NaCl a 10,2 % (p/v) aproximou-se de 7,0. No entanto, seus experimentos foram executados em meio líquido incubado em shaker a 200 rpm.

Para extratos de surfactantes provenientes da coluna inoculada com isolados de LBBMA 4951, foi obtida uma DMC cujo valor corresponde ao dobro daquele verificado para os extratos dos isolados de LBBMA 4951, ou seja, aproximadamente 10. Fernandes (2007) obteve valores máximos de DMC próximos de 4,5, para extratos de surfactantes produzidos por isolados de *B. subtilis* LBBMA 155 cultivados em anaerobiose e em meio mineral E suplementado com glicose a 2,0 % (p/v), porém, sem adição de NaCl. No ensaio em que LBBMA 4914 e LBBMA 4951 foram injetados em cultura mista, foi obtido um valor de DMC próximo de 8, ou seja, valor intermediário entre aqueles obtidos para as culturas puras. Esse fato pode estar relacionado com a taxa de crescimento dos isolados de LBBMA 4951 que supera a taxa de crescimento verificada para os isolados de LBBMA 4914 (Figura 11). Os isolados de LBBMA 4951 podem estar competitivamente mais adaptados às condições experimentais que os isolados de LBBMA 4914, o que os levaria a produzir a maior parte dos surfactantes detectados nos efluentes da cultura mista, embora

os valores de DMC verificados para a cultura mista tenham ficado um pouco abaixo daqueles obtidos para os efluentes das colunas inoculadas com culturas puras dos isolados de LBBMA 4951. Esse fato pode estar relacionado ao consumo de parte dos componentes do meio E pelos isolados de LBBMA 4914 quando os isolados se encontravam em culturas mistas. A DMC relacionada à cultura mista (DMC = 8) pode ainda ter ficado um pouco acima da DMC média (DMC = 7,5) graças a uma interação sinérgica entre os surfactantes produzidos por ambos, o que propicia maior estabilidade das micelas formadas pelos surfactantes. A ocorrência desse tipo de interação é também relatada por Batista (2008) e a maior estabilização de micelas constituídas por misturas de surfactantes é amplamente relatada na literatura (McInerney *et al.*, 2004b; Razafindralambo *et al.*, 1997; Sabatini *et al.*, 2000; Szymczyk *et al.*, 2005; Youssef *et al.*, 2007b).

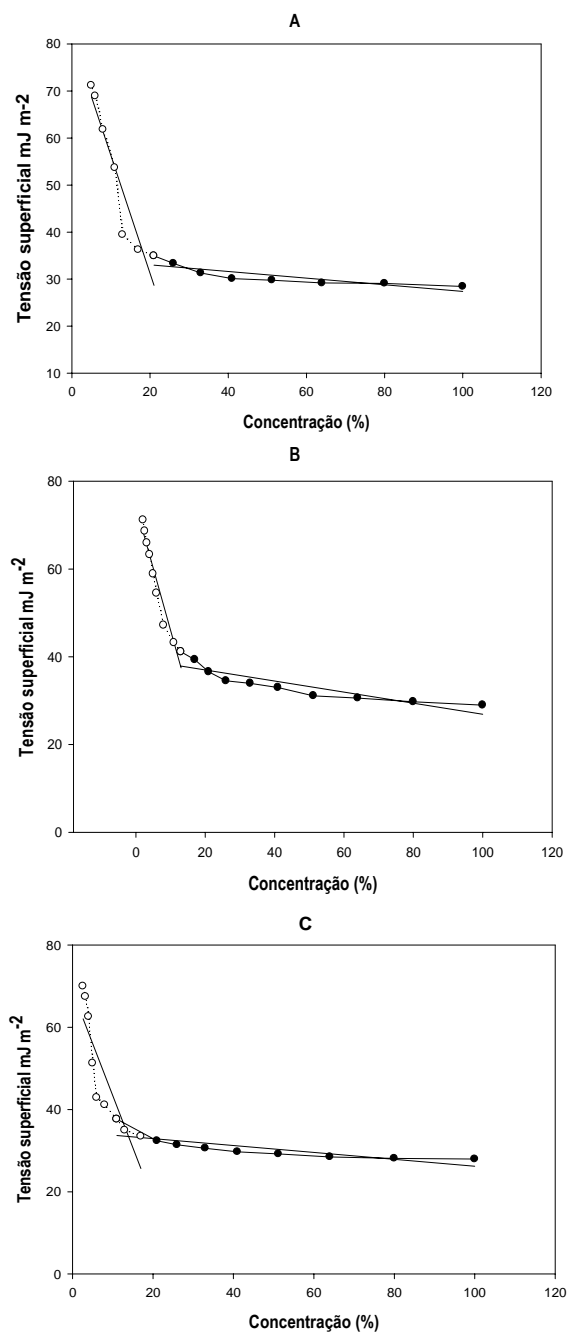


Figura 8. Relação entre tensão superficial (mJ m^{-2}) e concentração de extratos de surfactantes (%) diluídos em água milliQ Millipore® e obtidos de efluentes de colunas inoculadas com culturas puras de LBBMA 4914 (A), LBBMA 4951 (B) e culturas mistas dos dois isolados (C).

4.9. Avaliação da toxicidade de extratos de surfactantes recuperados de culturas mistas dos isolados de *B. subtilis*

Considerando-se que surfactantes lipopeptídicos, produzidos por isolados de *B. subtilis*, apresentam propriedades antibióticas e ainda que a inoculação nos meios porosos, visando à recuperação de óleo pesado, foi executada com suspensões de isolados de *B. subtilis* em cultura mista, ensaios foram conduzidos a fim de se avaliar os efeitos dos surfactantes produzidos pela cultura mista sobre o crescimento dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951. Inicialmente, foram obtidas curvas de crescimento para os isolados de *B. subtilis* LBBMA 4914 e LBBMA 4951, inoculados separadamente em meio mineral E contendo NaCl a 5,0 % (p/v) e glicose a 2,0 % (p/v), incubado a 30 °C e a 200 rpm por 12 horas. Os valores de DO₆₀₀, registrados ao longo das 12 horas de cultivo, não apresentaram diferenças significativas em relação aos valores de DO₆₀₀ obtidos quando extratos de surfactantes (ES), recuperados de colunas inoculadas com a cultura mista, foram adicionados ao meio E na concentração final de 2CMC. Em outras palavras, as curvas de crescimento para cada isolado de *B. subtilis*, obtidas na presença e na ausência dos extratos de surfactantes recuperados de efluentes de colunas inoculadas com culturas mistas dos dois isolados, não apresentaram diferenças expressivas (Figura 11; A e B). Por se tratar de uma cultura mista composta de isolados da mesma espécie, possivelmente algum sistema de proteção celular seja capaz de inibir os efeitos deletérios dos surfactantes lipopeptídicos produzidos por elas mesmas.

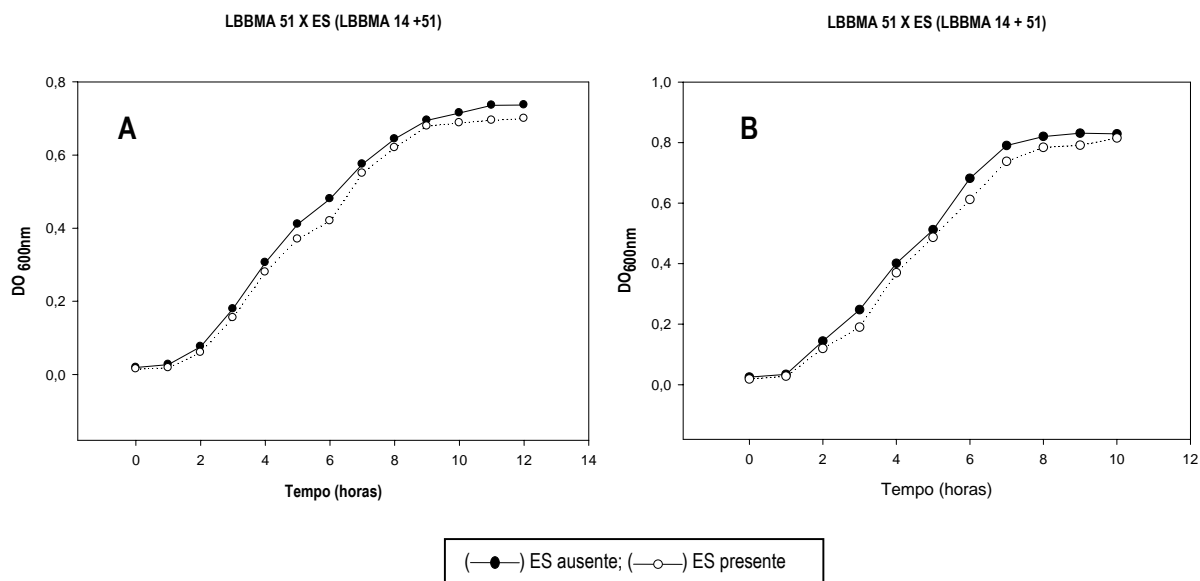


Figura 11. Efeitos de extratos de surfactantes (ES), obtidos de efluentes de colunas inoculadas com as culturas mistas dos isolados de *B. subtilis* e adicionados ao meio de cultivo, sobre o crescimento de culturas puras dos isolados de LBBMA 4914 (A) e de LBBMA 4951 (B). Os extratos de surfactantes foram acrescentados ao meio de cultivo para uma concentração final correspondente a 2CMC.

4.10. Avaliação da recuperação de óleo pesado das colunas inoculadas com os isolados de *Bacillus* selecionados

Dentre os tratamentos de recuperação de óleo pesado aplicados aos meios porosos não-consolidados, os tratamentos 3 e 5 propiciaram os melhores resultados de recuperação na etapa terciária, ou seja, 12,9 % e 10,3%, respectivamente (Tabela 7). No tratamento 3 foi efetuada a injeção de esporos em meio E das culturas mistas dos isolados de *B. subtilis* selecionados e no tratamento 5 foi efetuada a injeção de água de produção contendo os ingredientes do meio E, com adição de glicose a 2,0% (p/v) para ambos os casos. Comparando-se o tratamento aplicado à coluna 4, em que os esporos das culturas mistas foram injetados em meio E contendo melaço a 5,0 % (v/v), ao tratamento aplicado à coluna 3, verificou-se uma redução de aproximadamente 70,0 % no volume de óleo pesado recuperado na etapa terciária de recuperação (Tabela 7). Isso indica que a glicose é a

fonte de carbono que melhor favorece a síntese de compostos úteis à MEOR pelos isolados de *B. subtilis* selecionados e inoculados nos meios porosos não-consolidados, incubados a 34 °C por 120 horas e saturados com o óleo pesado. Batista (2008) constatou a recuperação de 9,0 % do total de óleo pesado (14,4 °API) contido em colunas empacotadas com areia e cuja mobilização foi atribuída à ação de misturas de surfactantes produzidos por isolados de *B. subtilis* LBBMA 155 e por isolados de *B. subtilis spizizenni* LBBMA 258, cultivados em meio mineral E contendo glicose a 3,0 % (p/v). Sua estratégia de recuperação, no entanto, baseou-se na injeção de extratos de surfactantes produzidos *ex-situ*, em anaerobiose, a 200 rpm e em condições mais brandas de salinidade, 1,025 % (p/v), e de temperatura, 30 °C.

A injeção das culturas puras dos isolados de LBBMA 4914 na forma de esporos e em meio E, tratamento 1, e dos isolados de LBBMA 4951 também na forma de esporos e em meio E, tratamento 2, possibilitaram a recuperação terciária efetiva de 0,15 mL e 0,11 mL, respectivamente, do óleo retido nos meios porosos não-consolidados (Tabela 7). Esses volumes correspondem a aproximadamente 49,0 % e 36,0 % do volume recuperado com o tratamento em que os isolados foram injetados em cultura mista (Tratamento 3; Tabela 7). Além desses, os resultados obtidos com o tratamento 5, recuperação de 0,23 mL de óleo, também superaram os resultados alcançados para os dois casos de injeção das culturas puras dos isolados de *B. subtilis* (Tabela 7). Os melhores resultados de recuperação de óleo, verificados para o tratamento 3, podem estar relacionados aos efeitos sinérgicos das misturas de surfactantes produzidos pelos isolados de *B. subtilis* sobre a tensão interfacial, conforme visto por alguns pesquisadores em seus trabalhos McInerney *et al.* (2002). Yakmov *et al.* (1997) obtiveram incrementos de 9,3 % na recuperação de óleo, contido em arenitos tipo *Berea*, pela ação de surfactantes produzidos por isolados de *B. licheniformis* BNP 29 neles inoculados. O tipo de petróleo usado, no entanto, classificava-se como leve (31,1 °API), com características de viscosidade e de densidade mais favoráveis à mobilização que óleos de natureza pesada.

Provavelmente os microrganismos autóctones presentes na água de produção, empregada no tratamento 5, tenham exercido papel de fundamental importância sobre a recuperação de óleo verificada após a aplicação daquele tratamento. A hipótese da presença de microrganismos em amostras da água de produção que favoreceram a recuperação de óleo baseia-se não somente nos resultados de recuperação verificados, mas também no aparecimento de colônias de bactérias, fenotipicamente parecidas com os isolados selecionados, crescendo na superfície de meio ágar-nutriente inoculado com amostras daquela água (dados não mostrados). Além disso, vale ressaltar que os isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 foram selecionados a partir de amostras de petróleo pesado e da mesma água de produção usada como o inóculo nas colunas submetidas ao tratamento 5. Na água de produção, armazenada em câmara fria, os microrganismos podem ter permanecido em estágio de dormência, na forma de esporos e em consórcio, até sua posterior reativação na presença do meio E contendo glicose a 2,0 % (p/v). Bao *et al.* (2009) verificaram que estratégias de bioestimulação possibilitaram ganhos de até 9,15 % na recuperação adicional de petróleo a partir da suplementação de meio nutritivo nos fluidos dispensados em poços de injeção. Os autores propõem que houve estímulos ao crescimento e metabolismo de bactérias autóctones presentes naquelas jazidas, capazes de sintetizar produtos úteis na recuperação de petróleo a partir da adição do meio nutritivo. Os resultados obtidos com o tratamento 5 revelam que a aplicação de estratégias de bioestimulação pode representar uma alternativa factível e interessante no que se refere a estratégias de recuperação avançada de petróleo. A definição adequada do meio de cultivo e das condições que promovem o crescimento e a síntese de produtos úteis à MEOR, pelas bactérias de interesse, é, contudo, etapa fundamental para a obtenção de êxito com a aplicação dessa estratégia.

No tratamento 6, em que não houve quaisquer tipos de inoculação, foi verificada a recuperação de 0,04 mL de óleo pesado na etapa terciária de recuperação. Esse volume recuperado pode estar relacionado à pressão exercida pelo fluido de extração, tampão PBS, que poderia remover

alguma quantidade de óleo no momento de sua injeção após a etapa de incubação das colunas. Por outro lado, apesar do pouco volume de óleo recuperado, existe ainda a hipótese de que a recuperação de óleo pode estar relacionada à atividade de microrganismos presentes no próprio óleo, estimulados pela injeção do meio E e pelas condições de incubação das colunas. Experimentos complementares, entretanto, são necessários para confirmar essa hipótese.

Os resultados gerais obtidos nessa etapa do trabalho comprovam a eficiência dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 em promoverem a recuperação de óleo pesado por meio da produção de metabólitos microbianos. A capacidade de produzirem surfactantes, eficazes na redução de tensões superficiais e interfaciais, certamente contribuiu para a mobilização e a recuperação do óleo contido nas colunas inoculadas. Além da capacidade de produção de surfactantes, outros fatores, no entanto, a exemplo da produção do *co*-surfactante 2,3-butanodiol e de ácidos orgânicos, podem também ter contribuído para a recuperação do óleo das colunas que receberam a inoculação microbiana. Tais fatores não podem ser desconsiderados e ensaios complementares são necessários para que seja possível avaliar a adequada participação e de cada um deles sobre o volume total de óleo recuperado. Estudos subseqüentes também fazem-se necessários a fim de se avaliar o potencial de aplicação dos isolados selecionados e da estratégia adotada nesse trabalho em experimentos em escala de campo. Dada a grande heterogeneidade das jazidas de petróleo espalhadas pelo mundo (Donaldson, 1990), é possível que as condições que favoreceram a maior recuperação de óleo nos meios porosos não-consolidados coincidam com as condições encontradas em uma jazida de petróleo qualquer, o que possibilitaria sua recuperação por meio da injeção da cultura mista dos isolados de *B. subtilis* aqui selecionados. Além disso, é preciso considerar que a estratégia adotada nesse trabalho pode ser extrapolada para jazidas de óleo leve, haja vista que o princípio de recuperação baseado na redução de tensões interfaciais independe do tipo de petróleo, e em se tratando de óleo de natureza leve, resultados ainda melhores de recuperação podem ser alcançados.

Tabela 7. Resultados de recuperação de petróleo pesado (14,4 °API) das colunas empacotadas com areia submetidas aos tratamentos 1 a 6.

		Tratamentos ou Colunas*					
		1	2	3	4	5	6
Recuperação secundária**	Petróleo retido (mL)	3,93	4,11	4,20	3,95	3,98	4,31
	Volume recuperado (mL)	1,41	1,51	1,49	1,39	1,36	1,57
	Recuperação (%)	35,9	36,7	35,7	35,2	34,3	36,5
Recuperação terciária***	Petróleo retido (mL)	2,52	2,61	2,71	2,56	2,62	2,74
	Volume recuperado (mL)	0,19	0,15	0,35	0,10	0,27	0,04
	Recuperação (%)	8,44	5,75	12,9	3,90	10,3	1,45
Total	Petróleo retido (mL)	2,37	2,50	2,36	2,50	3,98	2,70
	Volume recuperado (mL)	1,60	1,66	1,84	1,49	1,59	1,63
	Recuperação (%)	44,34	42,45	48,6	39,1	44,6	37,95

* Os tratamentos 1 e 2 referem-se, respectivamente, à inoculação das colunas com culturas puras dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951, na forma de esporos e suspensos em meio E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v). O tratamento 3 refere-se à inoculação das colunas com suspensões de esporos de culturas mistas dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 em meio E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v). O tratamento 4 refere-se à inoculação das colunas com as culturas mistas nas mesmas condições, porém, substituindo-se a glicose por melaço tratado a 5,0 % (v/v). No tratamento 5 foi injetada água de produção juntamente com os componentes do meio E adicionado de glicose a 2,0 % (p/v). No tratamento 6 (controle) foi avaliada a recuperação de petróleo a partir da injeção de meio E contendo apenas glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v).

** Os volumes de petróleo recuperados na etapa de recuperação secundária foram obtidos a partir da injeção de tampão PBS até obtenção de saturação residual de petróleo nas colunas.

*** Os volumes de petróleo recuperados na etapa de recuperação terciária foram obtidos após a aplicação dos diferentes tratamentos e incubação das colunas a 34 °C por 120 horas em BOD.

4.11. Avaliação da colonização microbiana no interior de meios porosos saturados com o óleo pesado (14,4 °API)

A presença de *Bacillus* no interior de colunas saturadas com o óleo pesado e inoculadas com as culturas mistas dos isolados selecionados foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 13). A visualização das bactérias, aderidas em partículas de areia retiradas de seções intermediárias (20 mm) das colunas, comprovou a efetividade do transporte celular até aquele segmento do meio poroso e, além disso, a capacidade de crescimento dos isolados inoculados na presença do óleo pesado. Colunas que receberam o tratamento 3, injeção da suspensão de esporos da cultura mista em meio E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v), foram as escolhidas para a observação microscópica, já que aquele tratamento propiciou os melhores resultados de recuperação de petróleo. Yakmov *et al.* (1997) também visualizaram em MEV a presença de células de *B. licheniformis* BNP-29 em segmentos iniciais e intermediários de *cores*, saturados com petróleo e inoculados com aqueles isolados. O petróleo utilizado pelos pesquisadores, no entanto, não era caracterizado como pesado, apresentando densidade de 0,85 g/cm³ em média.

Considerando-se que a estratégia de recuperação do óleo pesado baseou-se principalmente na ação de surfactantes produzidos pelos isolados de *B. subtilis* LBBMA 4914 e LBBMA 4951, a constatação do crescimento microbiano em seções intermediárias do sistema favorece a efetivação da recuperação de óleo baseada naquela estratégia, já que os surfactantes produzidos pelos isolados naquele segmento podem atingir demais pontos do sistema via dispersão pela injeção de fluidos de arraste. Em outras estratégias de recuperação, a exemplo daquelas baseadas em entupimentos seletivos, a colonização de grandes extensões e de maior profundidade nos sistemas porosos pelos isolados inoculados é fundamental para se atingir os objetivos propostos.

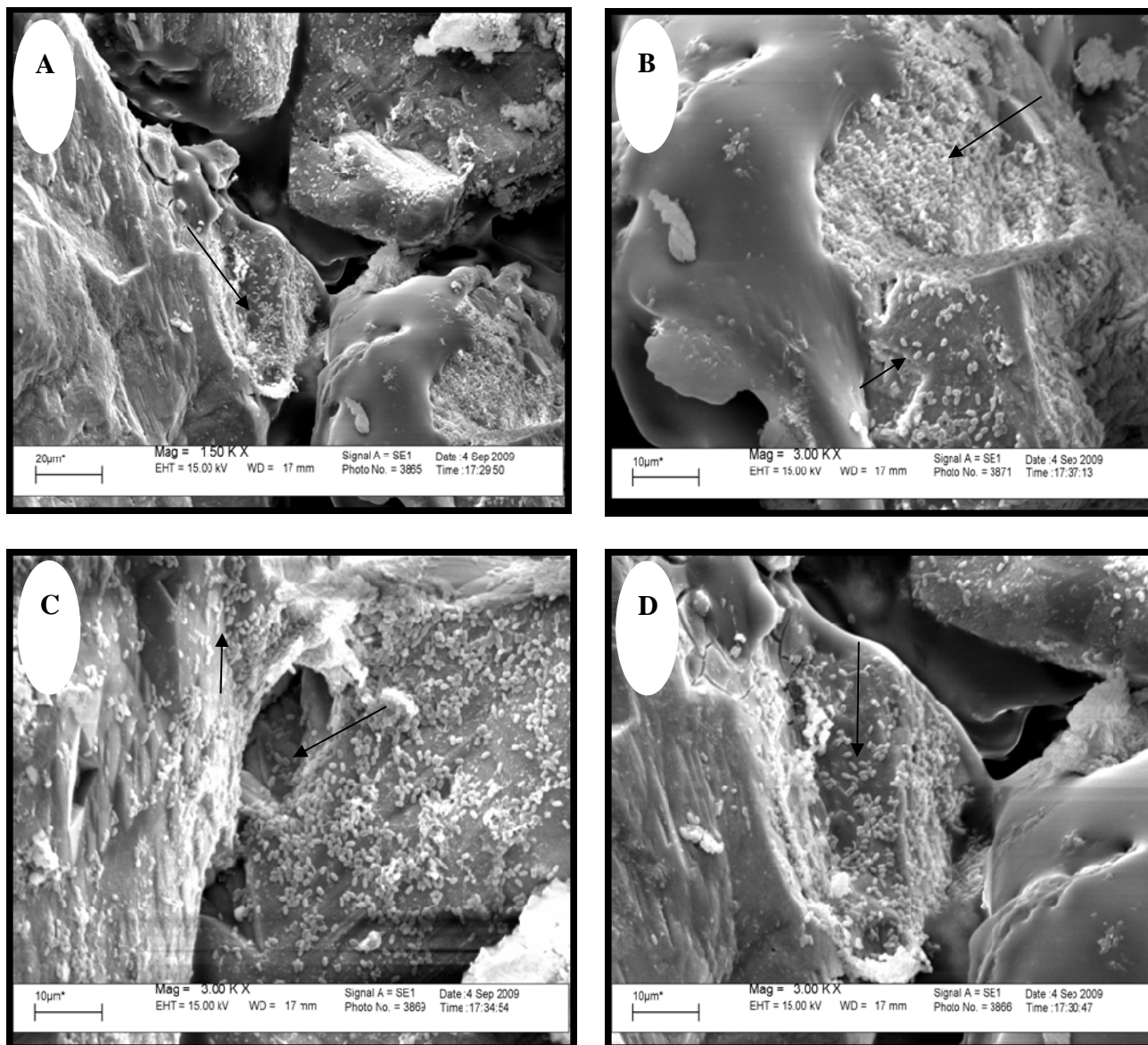


Figura 13. Micrografias (MEV) de partículas de areia retiradas de porções intermediárias (20 mm) de colunas saturadas com óleo pesado (14,4 °API) e inoculadas com culturas mistas dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 (Tratamento 3). A coluna foi escolhida para observação em MEV com base nos resultados de recuperação de petróleo obtidos. Em detalhe (*setas*) células de *Bacillus* aderidas às partículas de areia retiradas do meio poroso. Aumentos de 1500X (A) e 3000X (B, C e D).

4.12. Avaliação qualitativa dos hidrocarbonetos constituintes do óleo pesado recuperado da coluna inoculada com a cultura mista dos isolados selecionados

A composição de hidrocarbonetos de cadeia média constituintes de amostras de óleo recuperadas da coluna que recebeu o tratamento 3, injeção das culturas mistas na forma de esporos suspensos em Meio E, apresentou variações qualitativas em relação às amostras de óleo recuperadas da coluna-controle, que não recebeu qualquer tipo de inoculação (Tratamento 6). Maior intensidade de sinal e maior número de picos cromatográficos foram verificados para a amostra de óleo proveniente da coluna inoculada com a cultura mista, sobretudo no intervalo entre 30 e 50 minutos de tempo de retenção, comparativamente aos resultados obtidos para a amostra proveniente da coluna-controle não inoculada (Figura 14; A e B). Isso indica maior concentração e enriquecimento de hidrocarbonetos característicos daquela faixa, ou seja, hidrocarbonetos de cadeia média, provavelmente produtos de biotransformações dos hidrocarbonetos de cadeia longa característicos das amostras de óleo pesado. As biotransformações ou quebras de hidrocarbonetos de cadeia longa podem ter sido promovidas pelos isolados de *B. subtilis* inoculados naquela coluna. Marinho (2008) reportou que isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* LBBMA 101b são capazes de promover biorrefino em amostras de petróleo pesado (14,4 °API), reduzindo a concentração de hidrocarbonetos de alta massa molecular característicos daquele tipo de óleo. Avaliações cromatográficas dos hidrocarbonetos de cadeia longa (saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos) presentes nas amostras de óleo pesado recuperadas das colunas podem, contudo, elucidar se realmente houve biotransformação estimulada pelos isolados de *B. subtilis* inoculados. Para isso, análises cromatográficas específicas e complementares fazem-se necessárias.

Após 50 minutos de corrida cromatográfica, avaliações por CG-MS indicaram expressiva redução no número de picos cromatográficos obtidos para a amostra de óleo proveniente da coluna inoculada com a cultura mista, comparativamente aos resultados obtidos para a amostra de óleo proveniente da coluna não inoculada (Figura 14; A e B). Essa alteração pode estar relacionada à atividade de biotransformação

exercida pela cultura mista sobre hidrocarbonetos de cadeia mais longa, conforme possibilidade também relatada por outros pesquisadores (Magot, 2004).

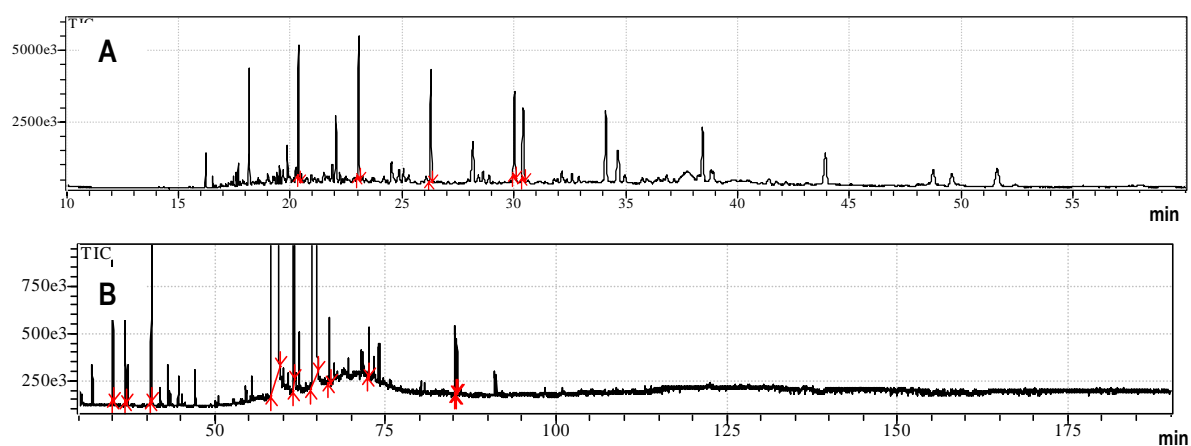


Figura 14. Perfil cromatográfico da amostra de óleo pesado (14,4 °API) recuperada da coluna submetida à inoculação da cultura mista dos isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 (A) e da amostra de óleo pesado recuperada da coluna-controle (B). As análises foram conduzidas em cromatógrafo a gás Shimadzu® QP5000 (Osaka, Japan), equipado com sistema de aquisição de dados Class 5000® e coluna capilar Nukol® de 100 m x 0.20 mm i.d. e filme de 0.25 µm (Bellefonte, PA, USA). A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C sendo elevada até 240 °C a taxa de 5 °C min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C sendo empregado gás hélio como fluido carreador a 1,3 mL min⁻¹. As amostras foram diluídas em diclorometano (Sigma®, USA), injetadas manualmente no cromatógrafo a gás na razão de split 69:1. O espectro de massas foi registrado na faixa *m/z* de 40 a 500 amu.

5. CONCLUSÕES

- Isolados de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 4914 e de *B. subtilis* LBBMA 4951 são capazes de produzir surfactantes em anaerobiose, a 34 °C e em meio mineral E contendo glicose a 2,0 % (p/v) e NaCl a 5,0 % (p/v);
- Culturas mistas de isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 apresentam elevada eficiência de transporte (70%), quando injetados em meios porosos não-consolidados, na forma de esporos, a 10⁶ UFC mL⁻¹ e suspensos em meio E contendo NaCl a 5,0 % (p/v) e glicose a 2,0 % (p/v);
- Surfactantes recuperados de meios porosos não-consolidados e inoculados com culturas mistas de isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 apresentam valores de tensão interfacial contra *n*-hexadecano até duas vezes inferiores aos valores obtidos para surfactantes recuperados de colunas inoculadas com culturas puras daqueles isolados;
- A inoculação em meios porosos não-consolidados de culturas mistas de isolados de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* LBBMA 4914 e de *B. subtilis* LBBMA 4951 na forma de endósporos possibilitam a recuperação de aproximadamente 13,0% de petróleo pesado contido no interior daqueles meios;
- Análises por cromatografia gasosa indicam que isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 são capazes de alterar a composição de hidrocarbonetos constituintes de amostras de óleo pesado recuperadas de meios porosos não-consolidados inoculados com culturas mistas daqueles isolados;

-
- Isolados de LBBMA 4914 e de LBBMA 4951 apresentam grande potencial para aplicação em processos de MEOR *in-situ*, especialmente em jazidas de petróleo pesado, sobretudo nas condições aqui definidas que melhor favoreceram a produção de surfactantes por aqueles isolados.
 - Experimentos complementares, no entanto, fazem-se necessários para a avaliação da viabilidade técnica e econômica da aplicação do processo proposto em escala de campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abram, M. B. Investigação Laboratorial da Injeção de Microrganismos em Meios Porosos. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Unicamp, Campinas (SP), 2000.

Amaral, P. F., Ferreira, T. F., Fontes G. C., Coelho, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes food and bioproducts processing, 2009.

Arima, K., Kakinuma A. & Tamura G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.31, p. 488-494, 1968.

Aslam, U. Mechanism of Microbe Propagation in Heterogeneous Porous Media and Analysis of Various MEOR processes Involved in Microbe Transportation. Society of Petroleum Engineers Middle East Oil & Gas Show and Conference held in the Bahrain International Exhibition Centre, Kingdom of Bahrain. March, 2009.

Bai, G., Brusseau, M. L., and Miller, R. M. Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. **63**, p. 1866-1873, 1997.

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

Banat, I.M., Makkar, R.S. & Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. **53**, p. 495-508, 2000.

Banat, I.M., Samarah N., Murad, M., Horne, R. & Banerjee S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **7**, 80–88. 1991.

Bannwart, A. C. & Trevisan, O. V. Óleos Pesados: Oportunidades e Desafios para a Pesquisa. CEPETRO on line, Ano 6, nº **19**, Campinas, 2006.

Bao, M., Kong, X., Jiang, G., Wang, X., Li, X. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. **66**, 42–46 , 2009.

Barbosa, A. Efeitos transients na perda de carga no escoamento óleo pesado-água em regime anular em duto metálico. Dissertação (Mestrado). Unicamp, Campinas, S.P. 102p. 2004

Barros, F. F. C.; Mano, M. C. R.; Bicas, J. L.; Dionisio, A. P.; Quadros, C. P.; Uenojo, M.; Santos, R. Dos & Pastore, G. M. Optimization of The Production of a *Bacillus subtilis* Biosurfactant Using Response Surface Method. Abstracts /*Journal of Biotechnology*, volume **131S**, p. S173, 2007c.

Barros, F. F. C.; Mano, M. C. R.; Bicas, J. L.; Dionisio, A.; Quadros, C. P.; Uenojo, M.; Neri, I. A. & Pastore, G. M. Production and Stability of *Bacillus subtilis* Biosurfactants Using Cassava Wastewater in a Pilot Scale. Abstracts /Journal of Biotechnology, volume 131S, p. **S172-S173**, 2007b.

Barros, F. F. C.; Quadros, C. P. De; Maróstica Júnior, M. R. & Pastore, G. M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicações em Alimentos. Química Nova, volume **30**, nº2, São Paulo, 2007a.

Batista, F. M. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* com elevada eficiência na mobilização de óleo pesado. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2008.

Berger, B.D. & Anderson, K.E.,1992. Modern Petroleum: A Basic Primer of the Industry. Penn Well Books, PennWell Publishing Company, Tulsa, Oklahoma.

Bezerra, M. S. Levantamento e avaliação de critérios para ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do norte. 2006.

Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surface, v. **12**, p. 41. 1998.

Bordoloi, N.K. & Konwar, B.K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. Colloids Surfaces B, v. **63**, p. 73–82, 2007.

Bossolan, N. R. S. *Desnutrição, transporte e crescimento de bactérias em meio poroso*. São Carlos, SP: UFSCar, 2000. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos.

Cameotra, S.S. & Makkar, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. **50**, p. 520-529, 1998.

Carillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F.J. & Ortiz, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1611**, p. 91-97.2003.

Christofi, N. & Ivshina, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, **93**, p.915-929, 2002.

Cooper, D. G.; Zajic, J. E. & Gerson, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. **37**, p. 4-10, 1979.

Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B. e Kosaric, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. **42**. p. 408-412. 1981a.

Crawfor, R., L., Crawfor, D., L. *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge University Press. New York (USA), 395p.,1996.

Cruz Ramos, H., L. Boursier, I. Moszer, F. Kunst, A. Danchin, and P. Glaser. Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO J*, **14**: 5984–5994. 1995.

Cunningham, A. B, Sharp R. R., Caccavo F., Gerlach R. Effects of starvation on bacterial transport through porous media. *Advances in Water Resources*, v. **30**, p. 1583–1592, 2007.

Curbelo, F. D., Santana, V. C., Barros, E. L., Dutra, T. V., Dantas, T. N., Castro, D., Afonso A. & Garnica, I. C. Adsorption of nonionic surfactants in sandstones. *Colloids and Surfaces A*, v. **293**, p. 1-4, 2007.

Dalla Riva, R. D. Densidade, porosidade, resistência à penetração da retenção de água em resposta ao arranjo e morfometria de partículas da fração areia. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Engenharia Civil, UFV, Viçosa, 2005.

Das, P., Mukherjee, S., Sen, Ramkrishna. Genetic Regulation of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. **25**, p.156-186, 2008.

Davis, D.A.; Lynch, H.C. e Varley, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enz Microb Technol*, v. **25**. p. 322-329. (1999).

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

Dietrich, F.L., Brown, F.G., Zhou, Z.H., Maure, M.A. Microbial EOR technology advancement: case studies of successful projects. SPE annual technical conference and exhibition. Denver, Colorado, USA. SPE Paper 36746, 1996.

Donaldson, E.C. Microbial enhancement of oil recovery recent advances. Proc. Int. Conf. MEOR, Norman, Okla., May-June, v.27, pp. 80-85, 1990.

Dong M., Mab, S., Liu, Q. Enhanced heavy oil recovery through interfacial instability: A study of chemical flooding for Brintnell heavy oil. Fuel, v. 88, 1049–1056, 2009.

Fernandes, P. L. Produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp. em Condições Anaeróbia. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2007.

Foerster, H.F.; Foster, J.W. Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. Journal of Bacteriology, v.91 (3), p.1168-1177, 1966.

Folmsbee, M. J.; Mcinerney, M. J. & Nagle, D. P. Anaerobic Growth of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* Requires Deoxyribonucleosides or DNA. Applied and Environmental Microbiology, v. 70, nº 9, p. 5252-5257, 2004.

Fontes, D. E., A. L. Mills, G. M. Hornberger, and J. S. Herman. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. Appl. Environ. Microbiol. v. 57. p. 2473–2481. 1991.

Fox, S.L. e Bala, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. Biores Technol, v. 75. p. 235-240. 2000.

Fuangswasdi, A.; Charoensaeng, A. ; Sabatini, D. A.; Scamehorn, J. F.; Acosta, E. J.; Osathaphan, K. & Khaodhiar, S. Mixtures of Anionic and Cationic Surfactants with Single and Twin Head Groups:

Solubilization and Adsolubilization of Styrene and Ethylcyclohexane. *Journal of Surfactants And Detergents*, v. **9**, nº 1, 2006.

Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Mehranian, M., Radmehr, M., Shahraki, K., Zolfagharian, F., Emadi, M. & Roayaei, E. Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v. **80**, p. 1073-1085, 2008.

Hall, C., Tharakan, J., Hallock, J., Cleveland, C. & Jefferson M. Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature*, v. **426**, p. 318–322, 2003.

Hamouda et al., 2002 T. Hamouda, A.Y. Shih and J.R. Baker. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores, *Letters in Applied Microbiology*, v.**34**, (2) pp. 86–90, 2002.

Hao, R., Lu, A. Biodegradation of heavy oils by halophilic bacterium. *Progress in Natural Science*, v. **19**, p. 997–1001, 2009.

Hitzman, D.O. Petroleum microbiology and the history of its role in enhanced oil recovery. In E. C. Donaldson and J. B. Clark (ed.). *Proceedings of the 1992 International Conference on Microbial Enhancement of Oil Recovery* pp. 162-218, 1983.

Jack, T. R. Microbially enhanced oil recovery. *Biorecovery*. v. **1**. p. 59-73, 1988.

Jang, L. K., Chang, P. W., Findley, J. E., & Yen, T. F. Selection of bacteria with favorable transport properties through porous rock for the application in microbial-enhanced oil recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, v. **46**, p. 1066-1072, 1983.

Javaheri, M. L., Jermeman, G. E., McInerney, M. J. & Knapp, R. M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, v. **50**, p. 698-700, 1985.

Jenneman, G. E. The potential for in-situ microbial applications. In: E. C. Donaldson and J. B. Clark (Editors). "Microbial enhanced oil recovery". *Developments in Petroleum Science* -22. Elsevier, New York (USA). 227p., 1989.

Joshi, C., Bharucha, S., Jha, S., Nerurkar, A. & Desai, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v. **99**, p. 195–199, 2008.

Kim, H., Yoon, B., Lee, C., Suh, H., Katsuragi, T. & Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. **84**, p. 41-46, 1997.

Kirkwood K. M., Ebert S., Kharbanda D., Foght J. M., Fedorak P. M., Gray M. R. Bioprocessing for Heavy Oil Viscosity Reduction. *Petroleum Chemistry Division Preprints*, v. **48**, p. 50-52, 2003.

Lazar, I., Petrisor, I.G., Yen, T.F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Petroleum Science and Technology*, v. **25**, p. 1353–66, 2007.

Li, Q., Kang, C., Wang, H., Liu, C. & Zhang, C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to daqing oilfield. *Biochemistry Engineering Journal*, v. **11**, p. 197-199, 2002.

Lima, T. M .S. Determinação Estrutural, Toxicidade, Biodegradabilidade e Eficácia de Biossurfactantes na Remoção de Fenantreno e Cádmio do Solo. Tese (Doutorado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2008.

Lima, T.M.S. Produção de biossurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 32p. 2003.

Madgan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. *Biology of Microorganisms* 10th edition. Prentice-Hall, New Jersey, p.183-236. 2004.

Magot, B., Ollivier, B. & Patel, B. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. **77**, p. 103–116, 2000.

Makkar, R. & Cameotra, S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. **18**, p. 37-42, 1997.

Makkar, R. S. & Cameotra S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. **20**, p. 48–52, 1998.

Maneerat, S., Nitoda, T., Kanzak, H. & Kawai, F. 2005. Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. **67**, 699–683, 2005.

Marinho, P. E. A. Estudo de bactérias capazes de mineralizar asfalto e petróleo pesado. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2008.

Marshall, S. L. Fundamental Aspects of Microbial Enhanced Oil Recovery: A Literature Survey. Csiro National Resource, 2008.

Maudgalya, S. Experimental and Numerical Simulation Study of Microbial Enhanced Oil Recovery Using . Tese (Doutorado) - Mewbourne School Of Petroleum and Geological Engineering, Norman, Oklahoma, 2005.

McInerney, M. J., Duncan, K. E., Youssef, N. H., Fincher, T., Maudgalya, S., Folmsbee, M. J., Knapp, R. M., Simpson, D. R., Ravi, N. & Nagle, D. P. *Final report to the U. S. Department of Energy: development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery.* DE-FC-02NT15321 R 02. University of Oklahoma, Norman, OK, 2002.

McInerney, M. J., Nagle, D. P. & Knapp, R. M. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future. In: M. Magot and B. Ollivier, *Petroleum Microbiology*, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C. pp. 215-237, 2004.

McInerney, M. J.; Maudgalya, S.; Knapp, R. & Folmsbee, M. Development of Biosurfactant-Mediated Oil Recovery in Model Porous Systems and Computer Simulation of Biosurfactant-Mediated Oil Recovery. Final Report, 2004a.

Mezzomo, C. C., Schiozer, D. J. Metodologia para Otimização de Injeção de Água para recuperação de Reservatórios de Petróleo. In: *I Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás*, 2001, Natal/RN.

Moses, V., Robinson, J. P., Springham, D. G., Brown, M. J., Foster, M., Hume, J., May, C. W., McRoberts, T. S. and Weston, A. Microbial enhanced oil recovery in North Sea reservoirs: a requirement for anaerobic growth on crude oil. In: E. C. Donaldson and J. B. Clarck (Editors), *Proceedings, 1982 International Conference on Microbial Enhancement of Oil Recovery*. NTIS, Spring-field. Va. Pp. 154-157, 1983.

Mukherjee, A.K. e Das, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiol Ecol*, v. **54**, 479–489, 2005.

Mukherjee, P. and Sen, R. Towards commercial production of microbial surfactants, *Trends in Biotechnology*, v. **24**, p. 509–515, 2006.

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

Muthusamy, K., Gopalakrishnan S., Kochupappy, T., Sivachidambaram, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, v. **94**, N. 6, 2008.

Nakano, M. M.; Dailly, Y. P.; Zuber, P. & Clark, D. P. Characterization of Anaerobic Fermentative Growth in *Bacillus Subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for The Growth. *Journal of Bacteriology*, v. **179**, nº 21, p. 6749–6755, 1997.

Nascimento, A. G. Transporte de *Bacillus* spp. em sistemas porosos. Viçosa, MG: UFV, 2004, 54 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Nelson, S., Launt, P. Stripper well production increased with MEOR treatment. *Oil and Gas Journal*, v. **89**, p. 114-119, 1991.

Nitschke, M & Pastore, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, v. **25**, nº 5, p. 772-776, 2002.

Nitschke, M. e Pastore, G. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v. **97**. 336-341. 2006.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.; Haddad, R.; Gonçalves, L.A.G.; Eberlin, M.N. e Contiero, J. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol Prog*, v. **21**. 1562-1566. 2004.

Nitschke, M.; Ferraz, C. & Pastore, G. M. Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. **35**, p. 81-85. 2004.

Nitschke, M.; Pastore, G. M. Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater. *Bioresource Technology*, v. **97**, p. 336–341, 2006.

Ohno, A.; Takashi, A.; Shoda, M. *Biotechnology and Bioenergy.*, v. **47**, p. 209, 1995.

Okpokwasili, G. C; Ibiene, A. A. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. *African Journal of Biotechnology*, v. **5**, nº 5, p. 453-456, 2006.

Ollivier, B. & Magot, M. *Petroleum microbiology*. Herndon, VA, USA: ASM Press, Washington, D. C. pp. 215-237, 2005.

Pineda-Flores G., Boll-Argüello G., Lira-Galeana C., Mesta-Howard A. M. A Microbial Consortium Isolated from a Crude Oil Sample that uses Asphaltenes as a Carbon and Energy Source. *Biodegradation*, v. **15**, 145–151, 2004.

Prince RC. Bioremediation of marine oil spills. *Trends Biotech* 1997;15:158–60. Pritchard PH, Mueller JG, Rogers JC, Kremer FV, Glaser JA. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. *Biodegradation*, v. **3**, 315–35, 1997

Ramos, H.C.; Hoffmann, T.; Marino, M.; Nedjari, H.; Presecan-Siedel, E.; Dreesen, O.; Glaser, P. e Jahn, D. Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *J Bacteriol*, v. **182**. 3072-3080,2000.

Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Deleu, M.; Hbid, C.; Jacques, P.; Thonart, P. & Paquot, M. Surface-Active Properties of Surfactin/Iturin A Mixtures Produced by *Bacillus subtilis*. *Langmuir*, v. **13**, p. 6026-6031, 1997.

Ron, Eliodora Z., Rosenberg, Eugene. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 2001; v. 3, 229-236.

Rossmann, M. Otimização da Produção e Propriedades Tensoativas de Biossurfactantes em Meios à Base de Melão e Manipueira. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2007.

Sabatini, D. A.; Knox, R. C.; Harwell, J. H.; Wu, B. Integrated design of surfactant enhanced DNAPL remediation: efficient supersolubilization and gradient systems. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 45, p. 99–121, 2000.

Santos, I. J. S., Aplicação da metodologia de superfície de resposta para otimização de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis spizizenii* RI4914. Trabalho de monografia, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, M.G., 2009.

Sarkar, A. K.; Georgiou, G.; Sharma, M. M. Transport of bacteria in porous media: I. An experimental investigation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 489-497, 1994.

Shecaira, F. S., Branco, C. C. M, Souza, A. L., Pinto, A. C., Holleben, C. R. C., Johann, P. R. S., *IOR: The Brazilian Perspective*. SPE 75170. 2002.

Singh, A.; Van Hamme, J. D. & Ward, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 99–121, 2007.

Sonenshein A. L., Hoch, J. A., Losick R. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.

Sullivan, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. **9**, nº 3, p. 263-269, 1998.

Szymczyk, K.; Zdziennicka, A.; Jańczuk, B.; Wojcik, W. The Properties of Mixtures of two Cationic Surfactants in Water at Water/Air Interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. **264**, p. 147–156, 2005.

Tabatabaee, A.; Assadi, M.M.; Saggadian, Noohi, A.A. e Sajadian, V.A. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoir. *Iranian J Env Health Sci Eng*, v. **2**, 6-12. 2005.

Van Hamme, J.D., Singh, A. & Ward, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. physiological aspects. *Biotechnology Advances*, v. **24**, 604-620. 2006.

Wei, Y.H. & Chu, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, v. **22**, 724-728, 1998.

Weiss, T. H. Effect of bacterial shape on transport of bacteria in porous media. *Environmental Science and Technology*, v. **29**, p. 1737-1740, 1995.

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

Yakimov, M., Amro, M., Bock, M., Boseker, K., Fredrickson, H., Kessel, D. & Timmis, K. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for *in-situ* enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. **18**, p. 147-160, 1997.

Yakimov, M., Timmis, K., Wray, V. & Fredrickson, H. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*, v. **61**, p. 1706-1713, 1995.

Youssef, N., Simpson, N., Duncan, D., McInerney, K., Folmsbee, M., Fincher, M., Knapp, R. In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, v. **73**, p. 1239–1247, 2007.