PÉRICLES LEONARDO FERNANDES

BIOSSURFACTANTES E POLÍMEROS DE *Bacillus subtilis* RI4914 E SUA APLICAÇÃO EM RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO

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
2011

PÉRICLES LEONARDO FERNANDES

BIOSSURFACTANTES E POLÍMEROS DE *Bacillus subtilis* RI4914 E SUA APLICAÇÃO EM RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO

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: 31 de agosto de 2011.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Co-orientador)

Prof. Nélio José de Andrade

Prof. Adriano Guimarães Parreira

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e guiar cada momento da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus orientadores, Professor Marcos Rogério Tótola e Professor Michael J. McInerney pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo e apoio na realização do meu trabalho e principalmente 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 e servidores do Departamento de Microbiologia, que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão dos meus trabalhos.

A todos os colegas de laboratório, por serem cúmplices do meu sucesso.

Aos meus pais Jair A. Fernandes e Maria da Conceição S. S. Fernandes e irmãos Vítor H. Fernandes e Érika C. Fernandes, por todo o amor e apoio incondicional.

À minha esposa Patrícia Bernardes Nobre, por todo amor e compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis.

BIOGRAFIA

PÉRICLES LEONARDO FERNANDES, filho de Jair Augusto Fernandes e Maria da Conceição Soares da Silva Fernandes, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 09 de agosto de 1982.

Em janeiro de 2005, diplomou-se em Biologia pela Universidade Estadual de Montes Claros.

Em agosto de 2005 iniciou o programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, na área de Microbiologia Ambiental, o qual foi concluído em Agosto de 2007.

Em agosto de 2007 iniciou o programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, na área de Microbiologia do Petróleo.

SUMÁRIO

RESUMO v

ABSTRACT vi

Capítulo 1: **MEOR - Recuperação de Petróleo Melhorada por Micro-organismos - Revisão** 1

1. Introdução 2
2. Recuperação de petróleo melhorado por micro-organismos – MEOR 4
3. Mecanismos de MEOR 4
   3.1. Os biossurfactantes como agentes de MEOR 5
   3.2. Biopolímeros 7
   3.3. Gases e Ácidos 9
4. Conclusões 10
5. Referências Bibliográficas 11

Capítulo 2: **Produção de biossurfactante, solventes e polímero por *Bacillus subtilis* RI4914 e seu potencial para a recuperação avançada de petróleo** 17

1. Introdução 18
2. Material e Métodos 21
3. Resultados e Discussão 26
4. Conclusões 37
5. Referências Bibliográficas 38

Capítulo 3: **Caracterização físico-química do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* RI4914** 41

1. Introdução 42
2. Material e Métodos 44
3. Resultados e Discussão 48
4. Conclusões 58
5. Referências Bibliográficas 59

Capítulo 4: **Recuperação de Petróleo em meio poroso não consolidado e a influência de parâmetros ambientais** 62

1. Introdução 63
2. Material e Métodos 66
3. Resultados e Discussão 71
4. Conclusões 83
5. Referências Bibliográficas 85

RESUMO

FERNANDES, Péricles Leonardo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Biossurfactantes e Polímeros de *Bacillus subtilis* RI4914 e sua Aplicação em Recuperação Avançada de Petróleo.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Antônio Galvão do Nascimento.

Neste trabalho foram realizados experimentos com o intuito de avaliar-se a propriedade dos biossurfactantes produzidos pelo isolado *Bacillus subtilis* RI4914 em reduzir a tensão interfacial e promover a recuperação de óleo residual em colunas empacotas com areia. Foi observado que a solução de biossurfactantes é capaz de mobilizar até 40% do óleo residual das colunas, porém somente em concentrações elevadas (2,0 g L^{-1}). Por outro lado, a utilização do sobrenadante da cultura do isolado RI4914 proporcionou recuperação de óleo superior à alcançada com a solução dos biossurfactantes e em concentração dez vezes menor da molécula. Tais resultados indicam a produção de compostos capazes de atuar sinergisticamente com os biossurfactantes na redução da tensão interfacial, alcançando valores de até 0,07 mN/m. Além disso, destaca-se a produção espontânea de polímero pela bactéria, molécula esta capaz de aumentar a viscosidade do sobrenadante e reduzir quase que pela metade o volume necessário para uma recuperação satisfatória de óleo residual. Os biossurfactantes apresentaram características físico-químicas comparáveis às do surfactante sintético SDS. Em termos de estabilidade, as moléculas demonstraram ter sua atividade pouco influenciada por condições extremas, principalmente no que se diz respeito às altas temperaturas. Esses resultados foram comprovados quando o sobrenadante da cultura foi avaliado quanto a sua capacidade em promover a recuperação do petróleo residual em salinidades variando entre 3 e 10% (p/v) de NaCl e em uma faixa de pH de 6,0 a 9,0. A recuperação de óleo pelo sobrenadante da cultura demonstrou ser também pouco influenciada pelas condições ambientais testadas, chegando a recuperar 88% do petróleo residual na presença de polímero. Esses resultados comprovam que os biossurfactantes descritos neste trabalho são substitutos em potencial para os surfactantes sintéticos frequentemente utilizados na indústria do petróleo.

ABSTRACT

FERNADES, Péricles Leonardo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Biossurfactantes e Polímeros de *Bacillus subtilis* RI4914 e sua Aplicação em Recuperação Avançada de Petróleo.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Antônio Galvão do Nascimento.

The aim of this study was to evaluate the ability of biosurfactants from *Bacillus subtilis* RI4914 to decrease the interfacial tension between oil and water and improve residual oil recovery from sand-packed columns. Injection of a partially purified biosurfactant solution into the columns led to a 40% recovery of residual oil, but only when at high concentrations (2.0 g L^{-1}). On the other hand, when the crude supernatant of *B. subtilis* RI4914 was used as the mobile phase, higher oil recovery was obtained, even with a much lower biosurfactant concentration (i.e. 0.2 g L^{-1}). These results show that this microorganism produces other molecules that my act synergistically with the biosurfactants to promote oil mobilization from the porous sand-core. The lowest interfacial tension measured between RI4914 supernatant and oil was 0.07 mN. m^{-1}. The bacterium can also produce a polymer which increases the viscosity of the supernatant and reduces the amount of biosurfactant solution needed for oil recovery. Biosurfactants produced by RI4914 showed physico-chemical properties comparable to that of the synthetic surfactant SDS. Extreme conditions, as high temperatures, had no effect on the biosurfactant stability. RI4914 supernatant was efficient in residual oil recovery in presence of NaCl (30-100 $g.L^{-1}$) and at pH of 6.0 to 9.0. 88% of residual oil was recovered from sand-packed columns when crude supernatant containing both biosurfactant and polymer was used as mobile phase. The results prove that the biosurfactant described in this work can efficiently replace synthetic surfactant for the purpose of petroleum recovery, especially if used together with the polymer produced by the same bacterial strain.

Capítulo 1

MEOR - Recuperação de Petróleo Melhorada por Micro-organismos - Revisão

1. Introdução

O petróleo esta presente em todo o mundo espalhado por uma complexa rede capilar dos reservatórios, sendo considerado, atualmente, uma fonte de energia indispensável, que move a industrialização e o crescimento econômico mundial. Globalmente, ~~1~~um trilhão de barris de petróleo têm sido recuperados de um total de ~~2~~ dois a ~~4~~ quatro trilhões de barris (Hall et al., 2003), e, em muitos países altamente industrializados com os Estados Unidos, a produção doméstica de óleo está em declínio, sendo a probabilidade do descobrimento de grandes novas reservas considerada baixa (McInerney et al., 2005).

As tecnologias atuais de exploração de petróleo podem recuperar um máximo de 40-45% de todo o óleo contido nos reservatórios, em dois estágios, nomeados de recuperação primária e secundária. Logo, essas operações convencionais de recuperação geralmente deixam dois terços do petróleo nos reservatórios. A recuperação primária corresponde aos métodos dependentes do fluxo natural de óleo por diferença de pressão entre as partes interna e externa do reservatório. Embora seja quase sempre o primeiro método adotado, sua implementação depende das características de cada reservatório, e se torna inviável a partir do momento em que a pressão interna diminui (Belyaev et al., 2004; Lazar et al., 2007). Quando isso ocorre, são adotados os métodos de recuperação secundária, que consistem na injeção de gás ou água dentro do reservatório, com o objetivo de manter a pressão interna e impulsionar o óleo para fora (Van Hamme et al., 2003; Belyaev et. al., 2004). Enquanto a recuperação primária é capaz de produzir de 5 a 10% da reserva total de óleo, a eficiência de recuperação da recuperação secundária gira em torno de 10 a 40% do petróleo (Van Hamme et al., 2003; McInerney et al., 2005). Essa baixa recuperação é atribuída a diversos fatores, mas principalmente à alta viscosidade do óleo presente nas jazidas e à alta tensão interfacial entre este e a água.

Em uma jazida de petróleo, o óleo se encontrado aprisionado nos poros de uma rocha denominada rocha reservatório. A mobilidade do petróleo nesse meio poroso e, consequentemente, sua recuperação é influenciada pelas variáveis (1) Número capilar (N_{ca}), calculada segundo a fórmula:

$$N_{ca} = (\mu_w . \nu_w) / (\sigma_{ow})$$

Onde μ_W representa a viscosidade da fase aquosa, ν_W representa o fluxo volumétrico do fluido, e σ_{OW} a tensão interfacial óleo/água; e (2) Razão de Mobilidade (***M***), dada pela fórmula:

$$M = (k_w.\mu_o) / (k_o.\mu_w)$$

Onde k_w representa a permeabilidade relativa da água na região preenchida com água, k_o é a permeabilidade relativa do óleo na região saturada de óleo, μ_o é a viscosidade do óleo e μ_w é a viscosidade da água. Situações que favoreçam maiores N_{ca} e $M < 1$ favorecerão a mobilização do óleo (McInerney et al., 2005).

Para suprir a crescente demanda por energia do mundo, novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de adiar ou reduzir o declínio na produção de petróleo e, ao mesmo tempo, aumentar as reservas exploráveis. Essas tecnologias incluem a utilização de técnicas mais sofisticadas, denominadas técnicas de recuperação melhorada de petróleo (enhanced oil recovery – EOR), que possuem a finalidade de aumentar a produção de óleo por meio do aumento de sua mobilidade no reservatório.

Dentre as técnicas de EOR, aquelas baseadas na utilização de microrganismos (MEOR – *Microbially Enhanced Oil Recovery*) são consideradas como as mais promissoras para a utilização em larga escala, uma vez vários produtos microbianos de interesse podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo (Fox e Bala, 2000; Maneerat, 2005; Nitschke et. al., 2005; Mukherjee et. al., 2006; Nitschke e Pastore, 2006). Pode-se destacar muitos produtos e atividades microbianas potencialmente úteis para as práticas de MEOR, dentre estes: ácidos, como ácido acético, butírico e lático; solventes, como etanol, butanol e acetona; gases, como CO_2 e CH_4; polímeros, como polissacarídeos e proteínas; bioemulsificantes, como heteropolissacarídeos e proteínas; e biossurfactantes, como glicolipídeos e lipopeptídeos (McInerney et. al., 2005). Resultados de experimentos de campo indicam que técnicas de MEOR podem ser consideradas economicamente viáveis, causando um incremento de apenas $3,00 por barril de petróleo extraído (Brown et. al., 2002; Strappa et. al., 2004).

Formatado: Fonte: Itálico

2. Recuperação de petróleo melhorada por micro-organismos – MEOR

Nos processos convencionais de EOR são utilizadas diversas estratégias para promover a mobilização do petróleo no reservatório. Esses processos fazem uso de surfactantes para a redução da tensão interfacial entre o óleo e a água e entre o óleo e as interfaces da rocha; polímeros são usados para aumentar a viscosidade da fase aquosa; ácidos, gases e solventes são usados para aumentar a permeabilidade através da rede de poros e para repressurizar o reservatório (Zobell, 1947; Khire et al., 1994; Bryant e Lindsey, 1996; Xu, 2005; Lazar et al., 2007). No entanto, os compostos utilizados são de origem petroquímica, obtidos do suprimento de petróleo após seu refino, o que torna sua utilização pouco atrativa financeiramente, uma vez que produtos finais são utilizados para a recuperação de material cru.

A MEOR baseia-se na produção microbiana de todos os compostos anteriormente mencionados, porém a partir de matérias primas de baixo custo e oriundas de fontes renováveis. Os micro-organismos capazes de produzir tais compostos são ubíquos nos reservatórios de todo o mundo, sendo crescente o conhecimento a respeito de sua habilidade em influenciar a mobilização do petróleo (Bass e Lappin-Scott et al., 1997). A MEOR apresenta outras duas vantagens sobre os processos convencionais de EOR: (1) As células microbianas necessitam de baixa quantidade de energia para a produção dos compostos de interesse na recuperação do óleo; (2) Os processos microbianos não dependem diretamente do preço global do petróleo.

3. Mecanismos de MEOR

~~Vários produtos microbianos de interesse podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo (Fox e Bala, 2000; Maneerat, 2005; Nitschke et. al., 2005; Mukherjee et. al., 2006; Nitschke e Pastore, 2006).~~

A produção de ácidos orgânicos pelo micro-organismos pode levar a dissolução de carbonatos na rocha fonte, aumentando assim a permeabilidade e a porosidade (Udegbunam et. al., 1991; Aldkins et. al., 1992b). Os solventes produzidos podem alterar a molhabilidade da interface óleo-rocha, liberando o óleo da matriz porosa. Devido a sua solubilidade preferencial em óleo, a produção de gases como CO_2 pode reduzir a

viscosidade do óleo, o que poderia torná-lo mais móvel e consequentemente facilmente recuperável. Os biossurfactantes são caracterizados como um grupo diverso de moléculas com diferentes estruturas químicas, como glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (Mukherjee et. al., 2006) que possuem a propriedade intrínseca de reduzir a tensão na interface óleo-rocha e óleo-flúido de injeção, reduzindo as forças capilares que previnem a movimentação do óleo pelos poros da rocha (Banat et. al., 2000). Muitos exopolímeros produzidos por diversas espécies bacterianas podem ser úteis na indústria do petróleo, principalmente como agentes de controle de mobilidade, aumentando a viscosidade do fluido de injeção e proporcionam maior recuperação de óleo. Um exemplo ~~disso muito~~ disso ~~utilizado~~ é a goma xantan (Holzwarth, 1985). Deve ser ressaltado ainda que esses compostos microbianos de interesse para a indústria do petróleo possuem a capacidade de atuar sinergisticamente no aperfeiçoamento da recuperação de óleo. Por exemplo, Maugdalya et. al. (2004) reportam que para existir uma recuperação significativa de óleo residual de colunas de areia e *cores* de arenito são requeridos pelo menos três produtos: um polímero, um biossurfactante e um álcool.

Formatado: Fonte: Itálico

3.1. Os biossurfactantes como agentes de MEOR

A EOR baseada em surfactantes representa um dos mais promissores métodos para a recuperação de uma porção substancial do óleo residual (Donaldson, 1991; Khire e Khan, 1994; Banat, 1995; Bass e Lappin-Scott, 1997; Van Hamme et al., 2003; Almeida et al., 2004). Nessa tecnologia, uma formulação aquosa de surfactante é injetada em um reservatório maduro, já em processo de declínio na produção. Ao entrar em contato com as gotículas de petróleo aprisionadas nos poros da rocha reservatório, o surfactante reduz dramaticamente a tensão interfacial (TI), o que acarreta na mobilização do óleo pelo aumento do número capilar (Jenneman et al., 1983; McInerney et al., 1990). A formação de uma emulsão óleo em água geralmente acarreta no aumento da taxa de mobilidade do óleo antes que o surfactante seja diluído ou perdido por adsorção à rocha. Experimentos em núcleos rochosos de arenito Berea demonstraram a habilidade dos surfactantes na recuperação do petróleo residual e seu potencial para a aplicação em EOR (Ayirala, 2002; Xu, 2005).

Assim como os surfactantes, os biossurfactantes desempenham um papel de destaque dentre as metodologias de MEOR (Brown, 1992; McInerney et al., 1990; Bryant e Lindsey, 1996; Tango e Islam, 2002). Sendo assim, a produção e os aspectos envolvidos

na aplicação de biossurfactantes raminolipídos, soforolipídeos, glicolipídeos e lipopeptídeos assumem uma grande significância industrial e, logo, têm sido extensivamente revisadas na literatura (Banat, 1995; Desai e Banat, 1997; Banat et al., 2000; Ron e Rosenberg, 2001). Embora os biossurfactantes glicolipídeos produzidos por isolados de *Pseudomonas* ~~tenham sido~~sejam ~~extensivamente~~ frequentemente usados em experimentos de MEOR, lipopeptídeos como a surfactina, liquenisina e complexos de lipídeos e polissacarídeos como o emulsan também são reportados como muito efetivos no processo de recuperação de óleo. A surfactina, um lipopeptídeo, e o mais potente surfactante microbiano conhecido na atualidade, ~~foi~~ pode ser produzido *ex situ*~~,~~ , ~~no~~no ambiente controlado de um fermentador, e utilizado com sucesso em processos de MEOR (Schaller et al., 2004).

~~Usualmente,~~ Os biossurfactantes, que são produzidos em fermentadores *ex situ*, são injetados com outros compostos no fluido de injeção para facilitar a emulsificação do óleo quando a água for injetada e melhorar a eficiência de recuperação. No entanto, a produção e aplicação *in situ* de biossurfactantes em um reservatório calcário também tem sido~~foi recentemente~~ reportada (Youssef et al., 2007).

3.1.1. Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*

Bactérias da espécie *B. subtilis* apresentam elevada capacidade de produção de biossurfactantes, tanto em condições aeróbias quanto em condições anaeróbias (Batista *et al.,* 2008; Fernandes, 2007; Lima, 2008; Rossmann, 2008; Parreira, 2009). Essas bactérias possuem a habilidade de produzir três tipos principais de biossurfactantes: surfactina, iturina e fengicina, com variações estruturais entre eles capazes de afetar suas atividades de modo apreciável (McInerney *et al.,* 2005). A surfactina, pertencente à classe dos biossurfactantes lipopeptídicos, é constituída por um ácido graxo (porção lipídica apolar) e um anel de sete aminoácidos (porção polar) (Mclnerney *et al.,* 2002). A surfactina merece destaque dentre os demais biossurfactantes produzidos por *Bacillus*, pois, apresenta uma série de funções biológicas exibindo propriedades bactericidas, fungicidas, antivirais, antitumorais e inibitórias na formação de coágulos (Barros et al., 2007a). 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.*, 2007a). 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).

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 mN m^{-1} e as tensões interfaciais contra *n*-hexadecano a 4,5 mN m^{-1}. Aquela linhagem foi ainda capaz de crescer a 55 ˚C e no meio de cultura contendo 7,0 % (p/v) de NaCl (Joshi *et al.,* 2008). Makkar e 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 petróleo 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.

3.2. Biopolímeros

Os biopolímeros têm sido utilizados em experimentos de MEOR principalmente para a produção de entupimentos seletivos em zonas de alta permeabilidade nos reservatórios (Lappin-Scott et al., 1988; Whitfield, 1988; Pollock, 1994; Almeida et al., 2004; Nazina et al., 2003). Desta forma, os biopolímeros são capazes de redirecionar o fluxo da água de injeção para os canais ainda ricos em petróleo, by-passando as zonas de

onde o óleo já foi removido (Sandford, 1979; Raiders et al., 1989; McInerney et al., 1985; Michael et al., 1999; Illias et al., 1999). Os entupimentos bacterianos normalmente envolvem a nutrição das células injetadas ou de bactérias indígenas. Essas bactérias e/ou nutrientes entram preferencialmente as zonas de alta permeabilidade, onde o crescimento da biomassa com a produção de biopolímeros promove o entupimento dos poros da rocha. Esse processo tende a equalizar a permeabilidade através do reservatório e restaurar a eficiência da recuperação secundária de petróleo (Whitfield, 1988; Bryant e Lindsey, 1996). O efeito dos biopolímeros na condutividade dos fluidos de injeção tem sido bem estudado em experimentos de laboratório por meio do uso de colunas empacotadas com areia e núcleos de arenito (Kalish et al., 1964; Clark et al., 1981; Jenneman et al., 1984; Vandevivere e Bayeve, 1992). Esses processos têm sido aplicados com sucesso em experimentos de campo, contribuindo para a prevenção da deterioração dos hidrocarbonetos por meio da equalização da permeabilidade dos reservatórios (Paulsen, 1997; Davey et al., 1998; Bryant, 2000; Fratesi, 2002).

O uso de polissacarídeos de origem microbiana para aumentar a viscosidade em fluidos de injeção já é bem conhecido. Espécies de *Xanthomonas* têm sido utilizadas na fermentação de carboidratos e na produção de um heteropolissacarídeo termoestável denominado goma xantan. A eficiência desse polímero como um agente de MEOR foi estudada através da sua injeção do polissacarídeo juntamente com cloreto de sódio em um reservatório experimental em laboratório (Kalish et al., 1964; Nazina et al., 2003; Vandevivere e Bayeve, 1992). Os processos de MEOR baseados na utilização da goma xantan envolvem a utilização de outros compostos químicos ou agentes de adsorção que previnem a adsorção do polissacarídeo na superfície da rocha. Cátions multivalentes são utilizados para ligar moléculas de polissacarídeo para o entupimento parcial e seletivo de reservatórios. O polissacarídeo também é utilizado em conjunto com poliacrilamida parcialmente hidrolisada e coreto de ferro para facilitar o aumento da viscosidade do fluido de injeção (Sheehy, 1990; Behlulgil e Durgut, 2003; Lachke, 2004). Suas propriedades de viscosidade, resistência mecânica e térmica e a tolerância ao sal fazem da goma xantan um polímero quase ideal para a utilização em processos de EOR (Pollock, 1994; Salome, 1996). Suas propriedades são consideradas superiores às da poliacrilamida, no entanto, ele é mais caro e mais vulnerável à degradação por micro-organismos (Mitchell e Nevo, 1964).

3.2.1. Produção de polímeros por *B. subtilis*

O exopolissacarídeo produzido por *B. subtilis* mais bem estudado é o levano, sendo esse encontrado nas formas tipo I e II. O levano tipo I é composto de monômeros de D-frutose ligados por ligação β-2,6. O tipo II é um polímero de frutose com um resíduo terminal de glicose ligado à cadeia por ligação α-glicosídica. O polissacarídeo pode ser sintetizado fora da célula após a produção da enzima extracelular levanosucrase (Abdel-Fattah et al., 2005; El-Refai et al., 2009). O levano é amplamente distribuído e produzido por várias plantas e micro-organismos, incluindo *B. subtilis* estirpes 327UH, ISS3119, QB112 e *Pseudomonas* sp. (Pereira et al., 2001; Shida et al., 2002).

O poli-γ-glutamato (γ-PGA) produzido por *B. subtilis* estirpe IFO3336 é um polímero viscoso, aniônico e atóxico composto por monômeros de D e L-glutamato e que apresenta massa molecular superior a 10.000 KDa. O γ-PGA de *B. subtilis* é composto de 50 a 80% de D e 20 a 50% de L-glutamato (Morikawa et al., 2006; Inbaraj et al., 2008). A síntese de γ-PGA requer energia, sedo que, sua síntese por *B. subtilis* parece estar ligada à formação de biofilme para aumentar a interação das superfícies celulares através de pontes salinas de cálcio e magnésio. A produção *in vitro* do polímero poderia também ser ativada durante a formação de biofilme em resposta a um aumento na salinidade e osmolariade do meio (Stanley e Lazazzera, 2005).

Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por uma estirpe selvagem de *B. subtilis*, crescida sob condições controladas de laboratório, podem exibir uma ampla variedade de tamanho (com pesos moleculares variando de 0,57 a 128 KDa) e composições químicas (polissacarídeos neutros, polímeros carregados, moléculas amfifílicas e proteínas) (Lin et al., 1999; Omoike & Chorover, 2004). Estudos envolvendo a utilização de espectroscopia do infravermelho (FT-IR) para a análise dos EPS livres e aderidos às células de *B. bubtilis* ATCC7003, crescido em caldo Luria, demonstraram a composição dos grupos funcionais da matriz depende da fase de crescimento das células, sendo que, uma maior proporção de EPS livres são produzidos durante a fase estacionária (Omoike & Chorover, 2004). A quantificação dos tipos de macromoléculas que compões essas matrizes indicou que as proteínas e os carboidratos são seus maiores componentes em massa, sendo que, o conteúdo de proteínas aumentou à medida que as células se aproximaram da fase estacionária (Omoike & Chorover, 2004). Os autores ressaltam porém, que mais estudos devem ser conduzidos a fim de se determinar a abundância e composição dos biofilmes produzidos por *B. subtilis* sob condições específicas.

3.3. Gases e Ácidos

A utilização de um consórcio microbiano para a produção de gases, solventes e ácidos, explorando os mecanismos de repressurização e dissolução de rochas carbonato, é uma prática antiga de MEOR (Ono et al., 2003; Lal et al., 2007). As bactérias podem fermentar carboidratos para a produção de gases como CH_4, CO_2 e H_2. Esses gases, quando produzidos *in situ*, podem contribuir para a elevação da pressão interna em reservatórios onde a mesma já sofreu uma depressão. Além disso, a dissolução de tais gases no petróleo pode levar a redução de sua viscosidade e consequentemente sua mobilização.

Benefícios adicionais do processo de fermentação dessas bactérias incluem a produção de ácidos como acético e propiônico e de solventes como acetona, etanol, 1-butanol e butanona. Tanto os gases quanto os solventes podem dissolver as rochas carbonato aumentando assim sua permeabilidade e porosidade. Clostridium acetobutylicum, Enterobacter cloacae e Methanobacterium têm sido as bactérias mais utilizadas nesses processos, justamente porque são micro-organismos encontrados na microbiota indígena dos reservatórios. Extensivas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de compreender-se a dinâmica de crescimento do biofilme bacteriano em sistemas poros, com o intuito de tirar vantagem da existência de micro-organismos capazes de promover a recuperação do petróleo residual em reservatórios maduros a um baixo custo operacional.

4. Conclusões

A MEOR representa um processo de recuperação de petróleo ambientalmente limpo, que emprega técnicas biotecnológicas capazes de substituir e superar as técnicas convencionais de EOR. A aplicação de um processo de MEOR a um poço de recuperação pode afetar positivamente a performance de outros poços visinhos, o que aumenta a eficiência do processo. Porém, uma melhor compreensão das características dos reservatórios, das características físico-químicas e fisiológicas dos consórcios microbianos, o controle e entendimento dos mecanismos de recuperação e dos processos econômicos são essenciais para que a MEOR se torne uma tecnologia viável para uma aplicação em escala global.

Um dos problemas enfrentados atualmente pela MEOR é que grande parte da literatura nesse contexto é baseada em dados laboratoriais, sendo difícil, se não impossível, utilizá-los para prever o que ocorrerá em campo, já que a performance microbiana em campo não é a mesma observada *in vitro*. Além disso, na maior parte da literatura, a interpretação dos dados de campo é problemática devido às múltiplas variáveis que mudam durante o processo de recuperação, sendo esses dados ainda não reprodutíveis devido à grande heterogeneidade existente entre os diferentes reservatórios. Devido a esses fatores poucos trabalhos apresentam análise pós-tratamento ou como os resultados foram calculados, ou ainda são capazes de explicar os mecanismos envolvidos na recuperação de óleo, o que ajuda a explicar porque a MEOR não ganhou ainda credibilidade na indústria do petróleo.

Em contrapartida, a maior parte dos experimentos de campo envolvendo MEOR foi finalizada nas últimas duas décadas, elevando a tecnologia da escala laboratorial para uma escala de aplicação em campo internacionalmente difundida e contribuindo para seu avanço no sentido de implementação em larga escala.

5. Referências Bibliográficas

Adkins, J. P., Tanner, R. S., Udegbunam, E. O., McInerney, M. J., e Knapp, R. M.. Microbially enhanced oil recovery from unconsolidated limestone cores. Geomicrobiol. J. 1992b; 10: 77-86.

Almeida PF, Moreira RS, Almeida RCC, Guimara˜es AK, Carvalho AS, Quintella C, et al. Selection and application of microorganisms to improve oil recovery. Eng Life Sci 2004;4:319–25.

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 1968; 31: 488-494.

Ayirala SC. Surfactant-induced relative permeability modifications for oil recovery enhancement. MS thesis, Department of Petroleum Engineering, Louisiana State University, 2002.

Banat IM. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Biores Technol 1995;51:1–12.

Banat IM. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal - state of the art. Acta Biotechnol 1995;15:251–67.

Banat, I.M.; Makkar, R.S. e Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000; 53: 495-508.

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.

Bass C, Lappin-Scott H. The bad guys and the good guys in petroleum microbiology. Oilfield Rev 1997;Spring:17–25.

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.

Behlu lgil K, Durgut I. Mathematical modeling of the soaking period in a microbial enhanced oil recovery application. Energy Sources 2003;25: 871–7.

Belyaev SS, Borzenkov IA, Nazina TN, Rozanova EP, Glumov IF, Ibatullin RR, et al. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery. Microbiol (Maik Nauka Interperiodica) 2004;73:590–8.

Brown FG. Microbes: the practical and environmental safe solution to production problems enhanced production and EOR. SPE J 1992; Paper no. 23955.

Brown, L.; Vadie, A.A. e Stephens, J.O. Slowing production decline and extending the economic life of an oil field: New MEOR technology. SPE Reserv Eval Eng 2002; 5:33-41.

Bryant SL, Lockhart TP. Reservoir engineering analysis of MEOR. SPE J 2000; # 63229.

Bryant SR, Lindsey RP. World-wide applications of microbial technology for improving oil recovery. SPE J 1996; Paper no. 35356.

Clark JB, Munnecke DM, Jenneman GE. In situ microbial enhancement of oil production. Dev Ind Microbiol 1981;22:695–701.

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. 1981; 42: 408-412.

Davey ME, Gavertz D, Wood WA, Clark JB, Jenneman GE. Microbial selective plugging of sandstone through stimulation of indigenous bacteria in a hypersaline reservoir. Geomicrobiol 1998;15:335–52.

Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev 1997;61:47–64.

Donaldson EC. Microbial enhancement of oil recovery—recent advances. New York: Elsevier; 1991.

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

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

Fratesi SE. Distribution and morphology of bacteria and their byproducts in microbial enhanced oil recovery operations. MS thesis, Mississippi State University, 2002.

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 2008; 80: 1073-1085.

Holzwarth, G. Xanthan and scleroglucan: structure and use in enhanced oil recovery. Dev. Ind. Microbiol. 1985; 26: 271-280.

Illias RM, Ooi SW, Idris AK, Rahman WA. Production of biosurfactant and biopolymer from Malaysian oil fields isolated microorganisms. SPE J 1999; Paper no. 57315.

Jenneman GE, Knapp RM, McInerney MJ, Menzie DE, Revus DE. Experimental studies of in-situ microbial enhanced oil recovery. SPE J 1984; Paper no. 10789, p. 33–7.

Jenneman GE, McInerney MJ, Knapp RM, Clark JB, Ferro JM, Menzie DE. A halotolerant, biosurfactant producing Bacillus species potentially useful for EOR. Dev Ind Microbiol 1983;24:485–92.

Joshi, C., Bharucha, S., Jha, S., Nerurkar, A. & Desai, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresource Technology 2008; 99: 195-199.

Kalish PJ, Stewart JA, Rogers WF, Bennett EO. The effect of bacteria on sandstone permeability. J Petrol Technol 1964;(July issue):805–13.

Khire JM, Khan MI. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1: Importance and mechanism of MEOR. Enzyme Microb Technol 1994;16:170–2.

Khire JM, Khan MI. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 2. Microbes and subsurface environment for MEOR. Enzyme Microb Technol 1994;16:258–9.

Lachke A. Xanthan - a versatile gum. Resonance 2004;(October issue): 25–33.

Lal B, Reddy MRV, Agnihotri A, Sarbhai AK, Prasad M, Singh N, et al. Process for enhanced recovery of crude oil from oil wells using novel microbial consortium. US Patent no. 20070092930, April 2007.

Lappin-Scott HM, Cusack F, Costerton JW. Nutrient resuscitation and growth of starved cells in sandstone cores: a novel approach to enhanced oil recovery. Appl Environ Microbiol 1988;54:1373–82.

Lazar I, Petrisor IG, Yen TF. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). Petroleum Sci Technol 2007;25(11):1353–66.

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.

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

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 1998; 20:48-52.

Maneerat, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2005; 27(3): 675-683.

Maugdalya, S.; Knapp, R.M.; McInerney, M.J.; Nagle, D.P. e Folsmbee, M.J. Development of a bio-surfactant-based enhanced oil recovery procedure. SPE 89473. **In Proceedings of the SPE/ DOE Improved Oil Recovery Symposium**. Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas (2004).

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 MJ, Javaheri M, Nagle Jr. DP. Properties of the biosurfactant produced by Bacillus licheniformis strain JF-2. J Ind Microbiol 1990;5:95–102.

McInerney MJ, Jenneman GE, Knapp RM, Menzie DE. In situ microbial plugging process for subterrranean formations. US Patent no. 4558739, 1985.

McInerney MJ, Nagle DP, Knapp RM. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future. In: Bernard O, Michel M, editors. Petroleum microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2005. p. 215–37.

Michael JM, Roy MK, John LC, Bhupathiraju VK, Coates JD. Use of indigenous or injected microorganisms for enhanced oil recovery microbial biosystems: new frontiers. In: proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology, 1999.

Mitchell R, Nevo Z. Effect of bacterial polysaccharide accumulation on infiltration of water through sand. Appl Microbiol 1964;12:219–23.

Mukherjee, S.; Das, P. e Sem, R. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol. 2006; 24(11): 509-515.

Nazina TN, Sokolova DS, Grigor'yan AA, Xue Y-F, Belyaev SS, Ivanov MV. Production of oil-releasing compounds by microorganisms from the Daqing Oil Field, China. Microbiology 2003;72:173–8.

Nitschke, M. e Pastore, G. Production and properties of a surfactant obtained from Bacillus subtilis grown on cassava wastewater. Biores. Technol. 2006; 97: 336-341.

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. 2005; 21: 1562-1566.

Ono K, Fujiwara K, Enomoto H. MEOR/MIOR field applications - biotechnological know - how is key to the success. In: Proceedings of the 13th RIPI congress on improved oil recovery, Iran. Website: /http://www.ripi.ir/en/ congress13/meor.pdfS; 2003.

Parreira, A. G. Produção de biossurfactantes e recuperação de óleo pesado em meios porosos não-consolidados. Tese (Doutorado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2009.

Paulsen JE, Oppen E, Bakke R. Biofilm morphology in porous media, a study with microscopic and image techniques. Water Sci Technol 1997;36:1–9.

Pollock TJ, Thorne L. Xanthomonas campestris strain for production of xanthan gum. US Patent # 5279961, 1994.

Raiders RA, Knapp RM, McInerney MJ. Microbial selective plugging and enhanced oil recovery. J Ind Microbiol 1989;4:215–30.

Ron EZ, Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants. Environ Microbiol 2001;3:229–36.

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

Salome M. Mutant strain of Xanthomonas campestris, process of obtaining xanthan, and non-viscous xanthan. US Patent # 5536651, 1996.

Sandford PA. Exocellular microbial polysaccharides. Adv Carbohydrate Chem Biochem 1979;36:265–312.

Schaller KD, Fox SL, Bruhn DF, Noah KS, Bala GA. Characterization of surfactin from Bacillus subtilis for application as an agent for enhanced oil recovery. Appl Biochem Biotechnol 2004;113–116:827–36.

Sheehy A. Recovery of oil from oil reservoirs. US Patent # 4971151, 1990.

Strappa, L.A.; DeLucia, J.P.; Maure, M.A. e Lopez Llopiz, M.L. A novel and successful MEOR pilot project in a strong water-drive reservoir. SPE 89456. In Proceedings of the SPE/ DOE Improved Oil Recovery Symposium. Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas (2004).

Tango MSA, Islam MR. Potential of extremophiles for biotechnological and petroleum applications. Energy Sources 2002;24:543–59.

Udegbunam, E. O., Adkins, J. P., Knapp, R. M., and McInerney, M. J. “Assessing the Effects of Microbial Metabolismand Metabolites on Reservoir Pore Structure.” SPE 22846. Proceedings of SPE annual Technical Conference and Exhibition. Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas (1991).

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev 2003;67(4):503–49.

Vandevivere P, Bayeve P. Effect of extracellular polymers on saturated hydraulic conductivity of sand columns. Appl Environ Microbiol 1992;58:1690–8.

Whitfield C. Bacterial extracellular polysaccharides. Can J Microbiol 1988;34:415–20.

Xu W. Experimental investigation of dynamic interfacial interactions at reservoir conditions. MS thesis, Department of Petroleum Engineering, Louisiana State University, 2005.

Youssef N, Simpson DR, Duncan KE, McInerney MJ, Folmsbee M, Fincher T, et al. In-situ biosurfactant production by Bacillus strains injected into a limestone petroleum reservoir. Appl Environ Microbiol 2007;73(4):1239–47.

Zobell CE. Bacterial release of oil from sedimentary materials. Oil Gas J 1947;2:62–5.

Capítulo 2

Produção de biossurfactante, solventes e polímero por *Bacillus subtilis* RI4914 e seu potencial para a recuperação avançada de petróleo

1. Introdução

As tecnologias atuais de exploração de petróleo, em sua maior parte, são baseadas em métodos dependentes do fluxo natural de óleo por diferença de pressão e da injeção de gás ou água no interior do reservatório de forma a impulsionar o petróleo para os poços produtores (23, 4). Essas tecnologias possibilitam, em geral, a mobilização de apenas 30 a 50% do óleo contido nos reservatórios (10), sendo essa baixa recuperação atribuída a diversos fatores, mas principalmente à alta viscosidade do óleo presente nas jazidas e à alta tensão interfacial entre este e a água.

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de adiar ou reduzir o declínio na produção de petróleo e, ao mesmo tempo, aumentar as reservas exploráveis. Essas tecnologias incluem a utilização de técnicas mais sofisticadas, denominadas técnicas de recuperação melhorada de petróleo (enhanced oil recovery – EOR), que possuem a finalidade de aumentar a produção de óleo por meio do aumentando sua mobilidade no reservatório (13).

Dentre as técnicas de EOR, aquelas baseadas na utilização de microrganismos (MEOR – Microbially Enhanced Oil Recovery) são consideradas como as mais promissoras para a utilização em larga escala, uma vez vários produtos microbianos de interesse podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo (7, 11, 17, 14, 16).

A produção de ácidos orgânicos pelo micro-organismos pode levar a dissolução de carbonatos na rocha fonte, aumentando assim a permeabilidade e a porosidade (21, 1). Os solventes produzidos podem alterar a molhabilidade da interface óleo-rocha, liberando o óleo da matriz porosa. Os biossurfactantes, caracterizados como um grupo diverso de moléculas como glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (14), possuem a propriedade intrínseca de reduzir a tensão na interface óleo-rocha e óleo-flúido de injeção, reduzindo as forças capilares que previnem a movimentação do óleo pelos poros da rocha (3). Muitos exopolímeros produzidos por diversas espécies bacterianas podem ser úteis na indústria do petróleo, principalmente como agentes de controle de mobilidade, onde aumentam a viscosidade do fluido de injeção e proporcionam maior recuperação de óleo. Um exemplo disso muito utilizado é a goma xantan (8). Deve ser ressaltado ainda que esses compostos microbianos de interesse para a indústria do petróleo possuem a capacidade de atuar sinergisticamente no aperfeiçoamento da recuperação de óleo. Por exemplo, Maudgalya e colaboradores (12) reportam que para existir uma recuperação significativa de óleo

residual de colunas de areia e cores de arenito são requeridos pelo menos três produtos: um polímero, um biossurfactante e um álcool.

Vários são os trabalhos de campo e laboratório que apresentam resultados positivos quanto à aplicação de técnicas de MEOR na recuperação de petróleo (9, 5, 12, 18, 24), porém, a dúvida que permanece não é se os micro-organismos podem aumentar a recuperação de óleo, e sim como empregar essa habilidade em uma prática economicamente viável e de maneira cientificamente válida (6). Segundo Banat (2), existem três principais estratégias para emprego da MEOR na recuperação de petróleo: (1) a produção dos compostos de interesse, em escalas industriais e *ex situ*, seguida da injeção destes no reservatório; (2) a adição de nutrientes selecionados ao reservatório, estimulando o crescimento da microbiota indígena capaz de produzir os compostos de interesse; (3) a injeção de uma cultura pré-selecionada dentro do reservatório, acompanhada da injeção de nutrientes que permitam seu crescimento e a produção dos compostos *in situ*.

A maior parte dos processos de MEOR, particularmente os métodos mais antigos, envolve a injeção de micro-organismos dentro do reservatório, no entanto, em alguns casos, esses micro-organismos causaram o entupimento dos poços, ou contribuíram para a corrosão dos equipamentos e dutos pela produção de sulfeto de hidrogênio. Tem sido sugerido que não somente as bactérias podem causar o entupimento dos poços, mas também produtos de seu metabolismo como, como hidróxido de ferro (22). Outro problema enfrentado pela MEOR é que grande parte da literatura nesse contexto é baseada em dados laboratoriais, sendo difícil, se não impossível, utilizá-los para prever o que ocorrerá em campo, já que a performance microbiana em campo não é a mesma observada *in vitro* (12). Devido a todos esses fatores poucos trabalhos apresentam análise pós-tratamento ou como os resultados foram calculados, ou ainda são capazes de explicar os mecanismos envolvidos na recuperação de óleo, o que ajuda a explicar porque a MEOR não ganhou ainda credibilidade na indústria do petróleo (12).

A bioestimulação tem sido apontada como uma possível solução para os problemas envolvendo as técnicas de MEOR (6), uma vez que a literatura mostra bons resultados envolvendo a utilização dessa técnica (5). Porém, isso ainda não elimina completamente os problemas, uma vez que seu sucesso dependeria da presença de micro-organismos capazes de produzir os compostos de interesse e ainda resistir à competição por parte dos demais. Além disso, tornar-se-ia quase impossível explicar quais seriam os mecanismos envolvidos na recuperação do óleo.

Uma solução definitiva para todos os problemas técnicos envolvendo a MEOR seria a produção dos compostos de interesse *ex situ* seguido da injeção dos mesmos no reservatório. Nesse processo todos os compostos seriam produzidos em escalas industriais e posteriormente seria procedida a formulação de um fluido de injeção com as características desejadas de tensão interfacial, viscosidade, presença ou não de ácidos e solventes. No entanto, esse tipo de técnica ainda é inviabilizada pelo alto custo da produção desses compostos em escalas industriais (14). Desta forma, mais trabalhos precisam ser realizados tendo como objetivo viabilizar a produção de um fluido de injeção com todas as características desejáveis para a recuperação de óleo, mas, principalmente, economicamente sustentável.

Em nossos trabalhos recentes o isolado de *Bacillus subtilis* RI4914 foi caracterizado como possível produtor de biossurfactante e outros compostos capazes de atuar sinergisticamente como o mesmo na mobilização do petróleo em colunas de areia. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção de biossurfactante, polímero e solventes pelo isoldado *B. subtilis* RI4914 em condições de micro-aerofilia.

2. Material e Métodos

2.1. Isolado bacteriano

A bactéria utilizada nos experimentos foi o isolado *Bacillus subtilis* RI4914, pertencente à coleção de isolados do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), Departamento de Microbiologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais). Essa bactéria foi isolada a partir de água de produção da formação Rio-Itaúnas, Conceição da Barra-ES. O isolado foi mantido em meio TSA e congelado a -80 ºC.

2.2. Efeito da fonte e da concentração de nitrogênio na produção de biossurfactante

Para avaliar se o efeito da fonte e da concentração de nitrogênio na produção de biossurfactante pelo isolado RI4914 foram montados nove tratamentos arranjados em um fatorial 2 X 3, composto por três concentrações de NH_4NO_3 (0,0, 0,5 e 2,0 g L^{-1}), três concentrações de extrato de levedura (0,0, 0,5 e 2,0 g L^{-1}) e com três repetições (Tabela 01).

Para o preparo do inóculo, a bactéria foi crescida por 18 horas a 30 ºC e agitação de 200 rpm, em meio MM com a seguinte composição (g L^{-1}): Sacarose (20,0), K_2HPO_4 (13,9), KH_2PO_4 (2,7), NH_4NO_3 (2,0) e 50 mL da solução de elementos traço (EDTA (0,5), $MgSO_4$ (3,0), $MnSO_4$. H_2O (0,5), NaCl (1,0), $CaCl_2$. $_2H_2O$ (0,1), $CoCl_2$. $6H_2O$ (0,1), $ZnSO_4$. $7H_2O$ (0,1), $FeSO_4$. $7H_2O$ (0,1), $CuSO_4$. $5H_2O$ (0,01), Na_2MoO_4 . $2H_2O$ (0,01), $NaSeO_4$ (0,01), $NaWoO_4$. $_2H_2O$ (0,01), $NiCl_2$ (0,02)). Após esse período as células foram lavadas duas vezes em solução de NaCl 0,85% (p/v) e transferidas para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio contendo os diferentes tratamentos com nitrogênio descritos anteriormente, de modo a obter-se DO_{600} inicial de 0,05. As culturas foram crescidas por 10 dias a 30 ºC e agitação de 200 rpm.

Ao final do experimento, a produção de biossurfactante foi avaliada pelo método do espalhamento de óleo segundo Youssef e colaboradores (25).

Tabela 01 -Tratamentos com nitrogênio utilizados para suplementar o meio MM de forma a avaliar seus efeitos na produção de biossurfactante, ácidos orgânicos, solventes e polímero pelo isolado *B. Subtilis* RI4914.

	Concentração das fontes de Nitrogênio (g L^{-1})	
Tratamentos	**NH_4NO_3**	**Extrato de Levedura**
1	0,0	2,0
2	0,5	2,0
3	2,0	2,0
4	0,0	0,5
5	0,5	0,5
6	2,0	0,5
7	0,0	0,0
8	0,5	0,0
9	2,0	0,0

2.3. Produção de biossurfactante, ácidos orgânicos, solventes e polímero pelo isolado RI4914

Os tratamentos do experimento anterior que apresentaram melhor produção de biossurfactante pelo isolado RI4914 foram selecionados para a realização do presente experimento. O inóculo foi preparado como descrito no item anterior, sendo o meio MM contendo os tratamentos selecionados inoculado de modo a obter-se DO_{600} inicial de 0,05. As culturas foram crescidas por 24 horas a 30 ºC e agitação de 200 rpm, sendo posteriormente transferidas para uma estufa, onde foram incubadas estaticamente a 30 ºC por 15 dias. Amostras diárias foram retiradas para a avaliação da atividade de biossurfactante, ácidos orgânicos, solventes e polímero.

2.4. Método do espalhamento de óleo

O método do espalhamento de óleo foi realizado segundo Youssef e colaboradores (25). Uma placa de petri (150 x 20 mm) foi preenchida com 100 mL de água deionizada e 30 µL de petróleo crú foram depositados na superfície da água de modo a se formar um filme de óleo. Uma gota de 10 µL do sobrenadante da cultura sem

células foi cuidadosamente depositada sobre o filme de óleo. A quantificação da atividade de biossurfactante se deu mediante a mensuração do diâmetro do alo claro formado no filme de óleo e posterior comparação com uma curva de calibração construída com a utilização de surfactina comercial.

2.5. Quantificação da produção de polímero

O volume de 100 mL das culturas foi centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos para a remoção das células, sendo o pellet formado descartado. O polímero foi precipitado do sobrenadante das culturas por meio da utilização de 2 volumes de isopropanol gelado. O precipitado obtido foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 xg, o pellet lavado duas vezes com isopropanol e posteriormente seco ao ar. O polímero obtido foi solubilizado em 100 mL de água MilliQ®, para a remoção das impurezas, precipitado novamente com 2 volumes de isopropanol gelado e centrifugado por 15 minutos a 12.000 xg. O composto obtido foi seco até peso constante a 80 ºC, sendo sua massa mensurada.

2.6. Análises em HPLC

As culturas foram avaliadas quanto à presença dos ácidos acético, láctico, fórmico e succínico e dos álcoois 2,3-butanodiol e etanol. Foi empregado HPLC DIONEX modelo Ultimate 3000, 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. Uma solução de H_2SO_4 (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.

2.7. Mensuração das tensões interfaciais óleo-água

Para a mensuração das tensões interfaciais entre o petróleo e as soluções surfactantes foi utilizado um tensiômetro *Spinning drop* Krúss, modelo Site100HS. Após o preenchimento do capilar do aparelho com as soluções surfactantes sob teste, uma gota de 10 µL de hexadecano ou petróleo (viscosidade 5,0 ou 15,0 cp) (fase leve) foi introduzida neste por meio da utilização de uma seringa. As leituras foram procedidas em

rotação de 4.000 rpm e temperatura de 35 ºC ou aquela determinada pelo tratamento. As tensões interfaciais entre o petróleo e as amostras foram mensuradas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, sendo a tensão interfacial real aquela obtida após alcançar-se a estabilidade dos valores mensurados.

O efeito da salinidade da solução surfactante na tensão interfacial foi avaliado por meio da adição de NaCl à solução surfactante de modo a obter as concentrações de 3, 5, 8, 10 e 12% (p/v). Também foi avaliado o efeito da temperatura da solução surfactante sobre a tensão interfacial óleo-água. Para isso, a tensão interfacial entre o óleo e a solução surfactante foi mensurada nas temperaturas de 35, 45, 55, 65 e 75 ºC.

2.8. Experimentos de recuperação de petróleo residual

Para a realização dos experimentos de recuperação de óleo, foram utilizadas colunas de vidro de 2,5 x 10 cm com volume variável (Kontes Flex Column, Fisher Scientific K420401-2510). Uma coluna foi tratada por vez. A coluna foi empacotada com 60 g de areia do mar lavada (Fisher Scientific S25-3) e saturada com água deionizada para a remoção do ar. Em seguida foram injetados 6,7 ml de petróleo cru, o que corresponde a 50% do volume poroso total da coluna. A coluna foi submetida ao tratamento com água deionizada até ser obtida a saturação residual de óleo ou até ser injetado um volume de água correspondente a 5 volumes de poro (VP) da coluna. O volume de óleo remanescente na coluna foi calculado pela diferença entre o volume injetado e o volume recuperado com água. Após este procedimento a coluna foi considerada pronta para o tratamento com as soluções surfactantes, compostas por: (1) solução de biossurfactante parcialmente purificado (2,0 g L^{-1}); (2) sobrenadante da cultura do isolado RI4914; (3) sobrenadante da cultura + polímero produzido pela própria bactéria. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo cada coluna tratada considerada uma repetição.

2.8.1. Quantificação do volume de petróleo recuperado e retido na coluna após o tratamento

O petróleo recuperado após o tratamento com água, assim como o petróleo retido na coluna após o tratamento com biossurfactante foi quantificado utilizando a técnica de extração por solvente proposta por Urum et al. (2004). O óleo recuperado pelo tratamento com água foi coletado em funis de decantação, sendo a água obtida no processo, drenada

pela abertura da válvula. O petróleo retido no funil foi extraído com 40 mL de n-Hexane. Ao final do experimento, a areia da coluna foi removida para um frasco de vidro com tampa de rosca, sendo seu petróleo residual extraído com 40 mL de n-Hexano. Os extratos obtidos, após serem efetuadas as diluições necessárias, foram submetidos a leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Os volumes de petróleo presentes em cada extrato foram determinados através da confecção de uma curva de calibração com extratos apresentando volumes conhecidos de óleo em n-Hexano.

2.9. Análise Estatística

Os dados experimentais foram apresentados como médias aritméticas de duas ou três repetições, sendo os desvios padrão mostrados pelas barras de erro. Os dados dependentes de efeito quantitativo foram avaliados por regressão. As análises foram feitas por meio da utilização do software Sigmaplot, versão 12.0.0.182 (SPSS Inc., UK).

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito da fonte e da concentração de nitrogênio na produção de biossurfactante

Com a realização de experimentos preliminares, pôde-se constatar que a concentração e a fonte de nitrogênio eram os principais fatores nutricionais capazes de afetar a produção de biossurfactante pelo isolado *B subtilis* RI4914. Com o intuito de se avaliar o real efeito desses fatores no crescimento do isolado e na produção de biossurfactante, foram montados nove tratamentos (sendo o tratamento sete o controle sem nitrogênio). A figura 1 mostra os resultados de produção de biossurfactante pela bactéria em condições de aeração constante do meio. No sobrenadante das culturas crescidas em meio MM com o tratamento nove pôde ser observada a maior atividade de biossurfactante, sendo essa equivalente a aproximadamente 200 mg L^{-1} de surfactina. Outros três tratamentos apresentaram atividade de biossurfactante, sendo esses os tratamentos 3, 5 e 6, com atividades de 9, 7 e 44,6 mg L^{-1} de surfactina, respectivamente.

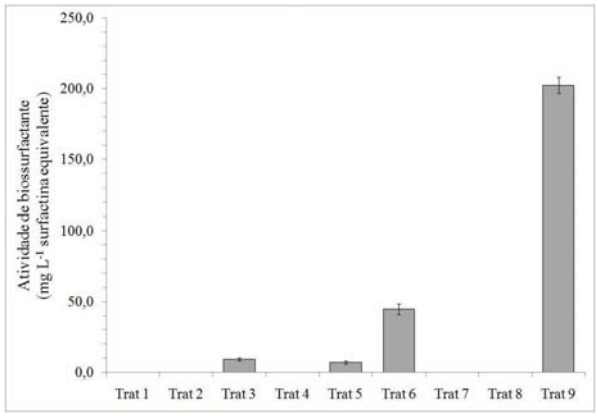

Figura 1. Atividade de biossurfactante no sobrenadante das culturas de *B. subtilis* RI4914 em tratamentos com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. As culturas foram crescidas por 10 dias a 30 ºC e 200 rpm.

A figura 2 mostra o crescimento do isolado em meio MM contendo os quatro tratamentos que apresentaram produção de biossurfactante. Tais tratamentos proporcionaram o crescimento satisfatório da bactéria, sendo este superior DO_{600} 3,8. O tratamento 5 apresentou o menor crescimento dentre os quatro, o que possivelmente foi atribuído à sua menor concentração total de nitrogênio, 1,0 g L^{-1}, comparada a 2 g L^{-1} do tratamento 9, 2,5 g L^{-1} do tratamento 6 e 4 g L^{-1} do tratamento 3. Esse menor crescimento pode explicar a menor produção de biossurfactante pela bactéria nesse tratamento. Os tratamentos 3, 6 e 9 apresentaram crescimentos semelhantes, porém, a produção de biossurfactante foi bastante diferenciada entre eles, o que indica que a fonte de nitrogênio influencia diretamente na produção de biossurfactante pelo isolado. Nas condições testadas nesse experimento, o melhor tratamento com nitrogênio foi aquele onde o nitrato de amônio foi utilizado como fonte única de nitrogênio, em uma concentração de 2,0 g L^{-1}. A presença de uma segunda fonte de nitrogênio, sendo neste caso o extrato de levedura, demonstrou inibir a produção de biossurfactante, mesmo quando o nitrato de amônio esteve presente na concentração de 2,0 g L^{-1}.

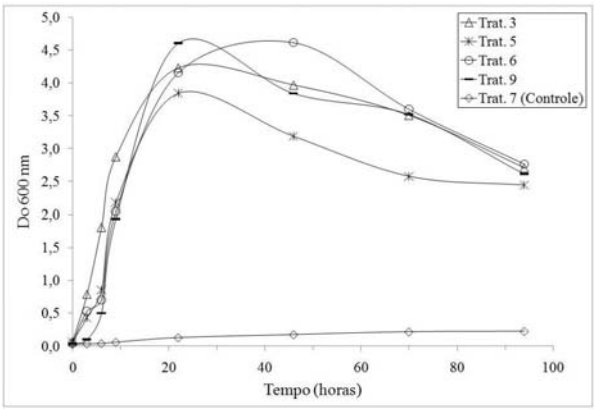

Figura 2. Crescimento de *B. subtilis* RI4914 em tratamentos com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. As culturas foram crescidas por 10 dias a 30 ºC e 200 rpm.

3.2. Produção de biossurfactante

Experimentos preliminares também revelaram que outro fator capaz de afetar a produção de biossurfactante pelo isolado RI4914 é a aeração da cultura, onde a oxigenação constante pode levar a uma menor produção do composto. Desta forma, decidiu-se incubar as culturas estaticamente, sendo essas aeradas por agitação somente uma vez por dia, quando da retirada das amostras. O meio MM contendo os tratamentos 3, 5, 6 e 9 foi inoculado e incubado sob agitação por 24 horas, de modo a permitir que as culturas atingissem uma alta concentração de células antes de ser interrompida a agitação.

As culturas foram avaliadas por 15 dias, sendo a produção de biossurfactante ilustrada pela figura 3. Pode-se observar que a produção de biossurfactante pela bactéria foi superior à obtida com agitação constante, apresentando, o melhor tratamento, uma atividade de biossurfactante 3 vezes superior ao melhor tratamento anteriormente testado (Figura 1). As culturas com os tratamentos 9 e 6 apresentaram atividades de biossurfactante superiores às obtidas nos demais tratamentos, sendo essas correspondentes à 633,71 e 615,86 g L^{-1} de surfactina. Um grande salto de atividade de biossurfactante pôde ser observado entre os dias 10 e 15 em todos os tratamentos testados. Esse salto condiz com a não agitação das culturas por um período de 5 dias, o que demonstra que o estresse por oxigênio pode aumentar a produção de biossurfactante pela bactéria, independentemente das condições nutricionais testadas.

3.3. Produção de polímero

Quando incubado estaticamente, o isolado RI4914 demonstrou-se capaz de produzir além de biossurfactante um polímero capaz de aumentar a viscosidade da cultura. Esse aumento de viscosidade é de extremo interesse para processos que envolvam a recuperação avançada de petróleo, uma vez que uma maior viscosidade da fase aquosa injetada no reservatório é capaz de reduzir a razão de viscosidade entre as fases aquosa e oleosa e, consequentemente, aumentar a recuperação de óleo (13). Desta forma, a escolha

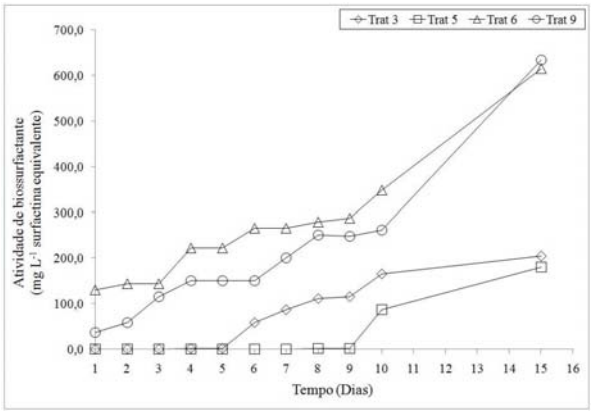

Figura 3. Atividade de biossurfactante no sobrenadante das culturas de *B. subtilis* RI4914 em tratamentos com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. As culturas foram crescidas estaticamente por 15 dias a 30 ºC.

do melhor tratamento a ser utilizado nos experimentos de recuperação de óleo, foi também baseada na concentração de polímero produzido no meio pela bactéria. Os tratamentos 9 e 6 apresentaram uma produção de polímero superior à encontrada nos demais tratamentos, sendo essas 4,16 e 3,47 g L^{-1}, respectivamente (Figura 4). Apesar da diferença entre os valores numéricos, a produção de polímero nesses dois tratamentos não pôde ser considerada diferente devido a variabilidade dos dados, porém, o tratamento 9 demonstrou maior reprodutibilidade na produção do composto. Deve-se ressaltar que somente os dois tratamentos anteriormente mencionados foram capazes de suportar a produção de polímero na sua forma integra, ou seja, aquela capaz de aumentar a viscosidade do meio. Apesar de ter sido quantificada a presença de polímero nos meios suplementados com os tratamentos 3 e 5, este não foi encontrado em sua forma íntegra, não sendo capaz de promover o aumento da viscosidade da cultura.

A produção de polímero em sua forma íntegra e de maneira constante parece estar relacionada diretamente com concentração total de nitrogênio presente no meio (NT), sendo que, esta deve ser grande o suficiente para proporcionar a sobrevivência por maior tempo das células, mas, pequena o suficiente para provocar um estresse nutricional. Os resultados podem ser classificados da seguinte forma: tratamento 9 (NT = 2,0 g L^{-1}) > tratamento 6 (NT = 2,5 g L^{-1}) > tratamento 3 (NT = 4,0 g L^{-1}) > tratamento 5 (NT = 1,0 g L^{-1}).

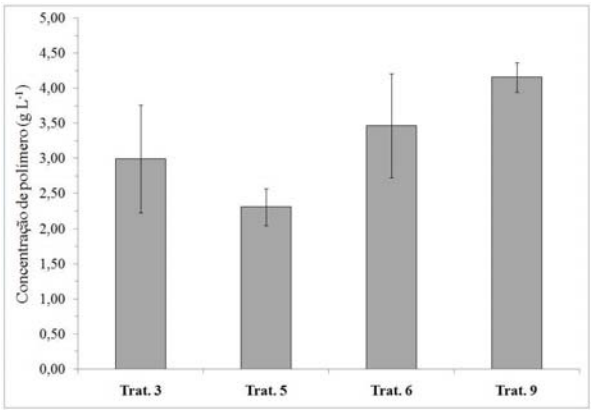

Figura 4. Concentração de polímero no sobrenadante das culturas de *B. subtilis* RI4914 em tratamentos com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio.

3.4. Produção de ácidos orgânicos e solventes

Segundo Youssef e colaboradores (25), quando uma gota de uma determinada solução surfactante é depositada em um filme de óleo disposto sobre a água, é observado o espalhamento do óleo com formação de um halo de diâmetro diretamente proporcional à concentração do surfactante presente na solução. A figura 5A mostra essa relação linear entre o espalhamento do óleo e concentrações crescentes de surfactina comercial (Sigma), com ajuste superior a 93%. No entanto, essa linearidade não é observada quando a solução surfactante testada é o sobrenadante da cultura do isolado RI4914 (Figura 5B). A relação entre a concentração do sobrenadante e o espalhamento de óleo pôde ser explicada por uma função polinomial de grau 3 (Ajuste 99,9%), onde a diluição do sobrenadante as cultura de 100% para 80% provoca uma redução brusca da capacidade deste em espalhar o óleo. Tal comportamento indica a possível presença de outros compostos capazes de atuar sinergisticamente com o biossurfactante, aumento sua atividade de superfície e consequentemente aumentando sua capacidade em espalhar o óleo.

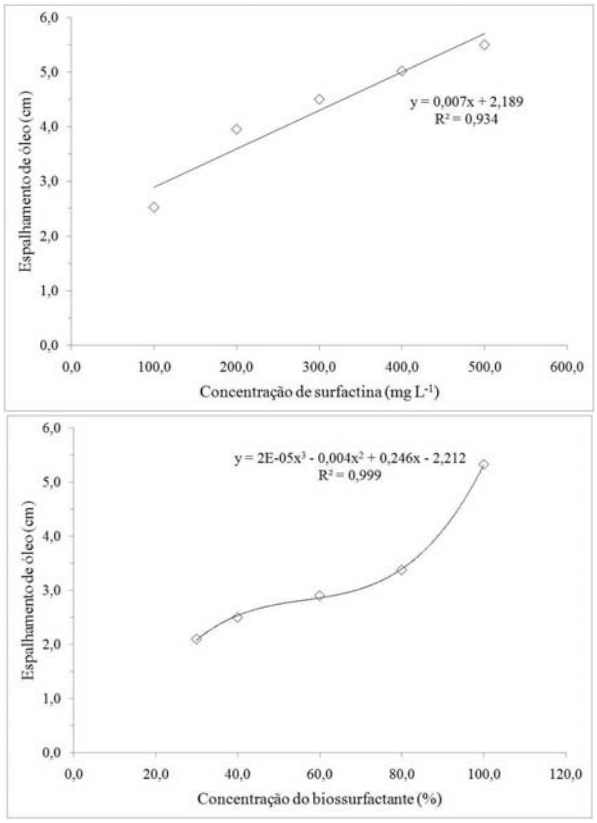

Figura 5. (A) Espalhamento de óleo por soluções contendo diferentes concentrações de surfactina comercial (Sigma) e (B) diferentes concentrações do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* RI4914 crescida estaticamente em meio MM com tratamento 9 (2,0 g L^{-1} NH_4NO_3).

Os tratamentos 6 e 9, por apresentarem os melhores resultados relativos à atividade de biossurfactante, foram avaliadas quanto a produção de ácidos orgânicos e solventes como os alcoóis etanol e 2,3-butanodiol. A figura 6 mostra a produção dos compostos ao longo dos quinze dias de experimento. Pode ser observado que tanto para o tratamento 6 quanto para o tratamento 9 o composto que apresentou maior concentração durante todo o experimento foi o acetato, chegando a atingir valores máximos de 1,38 e 0,82 g L^{-1} para os tratamentos 6 e 9, respectivamente. Outros sais de ácidos orgânicos, comumente associados ao metabolismo fermentativo de *Bacillus subtilis*, não foram identificados, como lactato e succninato (15). Os alcoóis etanol e 2,3-butanodiol foram eventualmente identificados nas culturas de ambos os tratamentos, mas ambos os compostos desapareceram antes do final do experimento.

A produção de etanol e 2,3-butanodiol por *Bacillus subtilis* está ligada unicamente à re-oxidação de co-enzimas reduzidas (19), podendo a concentração desses compostos no sobrenadante estar ligada às variações da concentração de oxigênio, uma vez que na presença deste, as co-enzimas reduzidas produzidas seriam naturalmente re-oxidadas na cadeia de transporte de elétrons com maior produção de ATP. Sendo assim, a interrupção da produção dos alcoóis pode acarretar no desaparecimento dos compostos por simples evaporação. A produção de acetato por *Bacillus subtilis*, porém, está diretamente ligada ao metabolismo energético da bactéria (23), o que poderia, em tese, explicar a produção contínua e em grande quantidade do composto durante todo o experimento.

Nenhuma relação pôde ser feita entre a produção de ácidos ou alcoóis e o aumento da atividade de biossurfactante no sobrenadante das culturas.

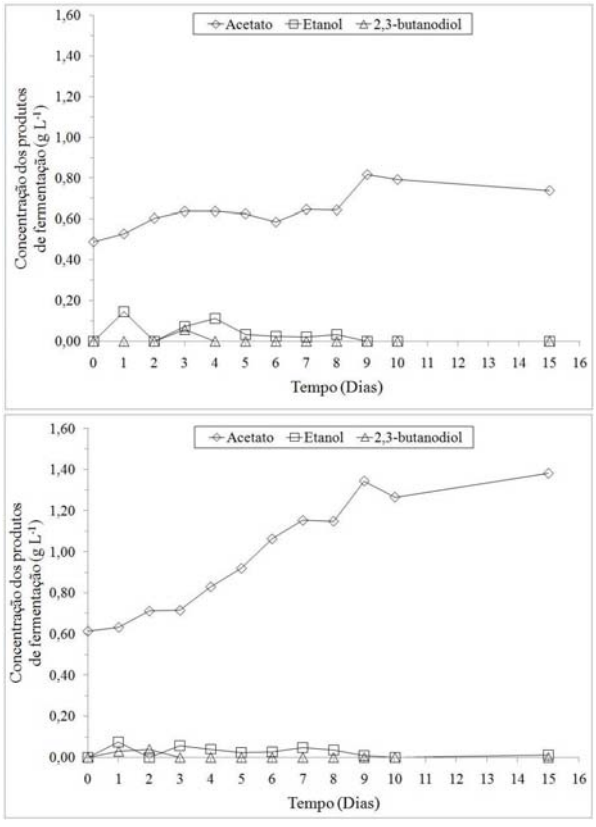

Figura 6. Produção de ácidos orgânicos e solventes por *B. subtilis* RI4914 em meio MM suplementado com (A) Tratamento 9 (2,0 g L^{-1} NH_4NO_3) e (B) Tratamento 6 (2,0 g L^{-1} NH_4NO_3 + 0,5 g L^{-1} de extrato de levedura).

3.5. Tensões interfaciais óleo-água

Os tratamentos 6 e 9 foram capazes de reduzir a tensão interfacial óleo-agua para valores ultra-baixos quando o hexadecano foi utilizado como fase leve, sendo os valores obtidos de 0,113 e 0,089 mN/m, respectivamente (Figura 7). As tensões interfaciais obtidas podem ser consideradas baixas o suficiente para reduzir significativamente as forças capilares que previnem a movimentação do petróleo em sistemas porosos, atestando o potencial dessas soluções surfactante para a utilização em processos de recuperação de melhorada de petróleo. No entanto, o tratamento nove foi escolhido para a realização dos demais experimentos devido aos demais parâmetros avaliados, uma vez que apresentou maior produção de polímero e maior atividade de biossurfactante.

A figura 8 mostra que a menor tensão interfacial mensurado com o sobrenadante da cultura do tratamento 9 foi 0,07 mN/m, sendo esse valor obtido quando petróleo 5,0 cp foi utilizado como a fase leve . Resultado bem diferente foi obtido quando petróleo 15 cp foi utilizado, sendo a menor tensão mensurada da ordem de 0,24 mN/m. Esses dados indicam uma grande influência da viscosidade da fase leve na obtenção de tensões interfaciais ultra-baixas.

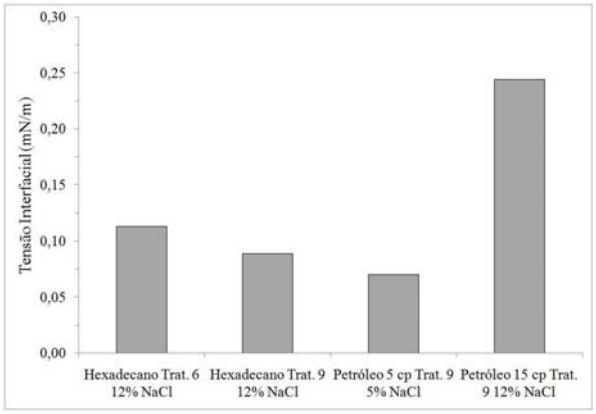

Figura 7. Tensões interfaciais mínimas obtidas entre o sobrenadante das culturas de *B. subtilis* RI4914 diferentes fases leve. Tratamento 9 (2,0 g L^{-1} NH_4NO_3); Tratamento 6 (2,0 g L^{-1} NH_4NO_3 + 0,5 g L^{-1} de extrato de levedura).

3.5.1. Efeito da concentração de NaCl

A adição de NaCl ao sobrenadante da cultura do isolado RI4914 (Tratamento 9) promoveu uma redução exponencial da tensão interfacial óleo-água (Figura 8). A tensão foi reduzida de aproximadamente 1,5 mN/m, na ausência de NaCl, para 0,099 mN/m quando o sal foi adicionado em uma concentração de 12% (p/v).

Segundo Sharma e Shah (20), a tensão interfacial é um parâmetro altamente dependente da salinidade da fase aquosa. Alterando-se a salinidade da fase aquosa pode-se alterar significativamente a solubilidade relativa do surfactante, o que levará a uma alteração do coeficiente de partição da molécula entre as duas fases. O aumento da concentração salina da fase aquosa promove a migração das moléculas surfactantes para a fase oleosa e, conseqüentemente, a redução da concentração do surfactante na fase aquosa. De maneira oposta, a redução da concentração salina na fase aquosa leva a um acúmulo de grande parte do surfactante nessa fase e, consequentemente, a redução da concentração dessas moléculas na fase oleosa. De acordo com os autores, a concentração ótima de sal é aquela capaz de promover o equilíbrio da distribuição do surfactante entre as fases aquosa e oleosa, o que leva a um acúmulo da molécula na interface das fases, culminando na geração de uma tensão interfacial ultra-baixa. Porém, o aumento da concentração salina para valores acima da concentração ótima levam novamente ao aumento da tensão interfacial.

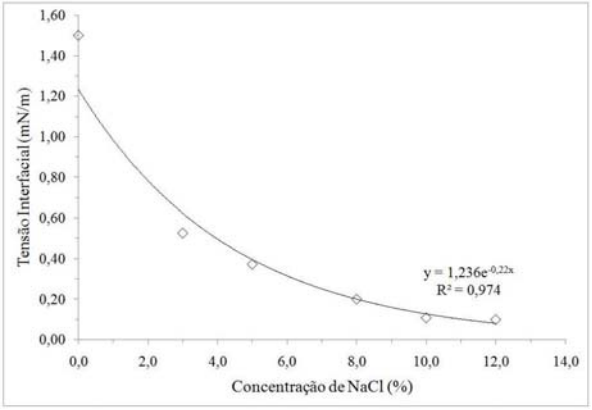

Figura 8. Efeito da concentração de NaCl do sobrenadante da culturas de *B. subtilis* RI4914 (Tratamento 9 - 2,0 g L^{-1} NH_4NO_3) na redução da tensão interfacial óleo-água. As mensurações foram feitas utilizando hexadecano como fase leve.

Esses fatos levam a crer que a maior concentração salina avaliada neste trabalho se aproxima, porém, não ultrapassa a concentração ótima para o biossurfactante sob teste, uma vez que não foi observado aumento da tensão interfacial. Esse dado pode ser considerado relevante do ponto de vista operacional, já que grande parte da água utilizada para a recuperação de petróleo apresenta elevados valores de concentração salina. Esse fato muitas vezes impede a utilização de surfactantes sintéticos, uma vez que estes apresentem valores de concentrações salinas ótimas muito inferiores às mencionadas.

3.5.2. Efeito da temperatura

A elevação da temperatura da solução surfactante teve um efeito positivo sobre a redução da tensão interfacial óleo-água, de forma que o valor de tensão reduziu de 0,099 mN/m, a 35 ºC, para 0,089, a 75 ºC (Figura 9). Essa redução, que pôde ser explicada por uma equação polinomial de grau 2, está ligada diretamente à redução da viscosidade do hexadecano em resposta à elevação da temperatura. Os dados obtidos nesse experimento também são considerados relevantes do ponto de vista operacional, já que muitos reservatórios apresentam temperaturas da mesma ordem das temperaturas mais altas testadas, o que poderia auxiliar na redução da tensão interfacial e na recuperação de petróleo.

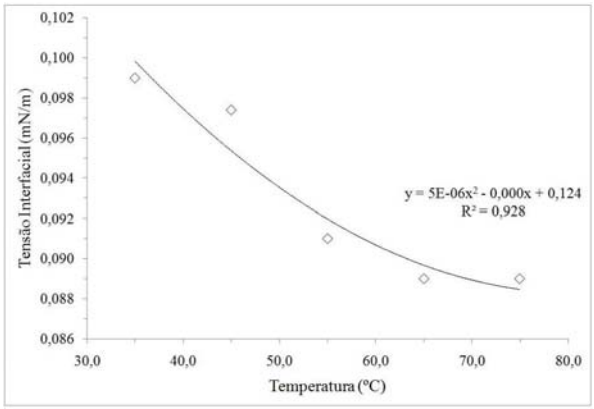

Figura 9. Efeito da Temperatura do sobrenadante da culturas de *B. subtilis* RI4914 (Tratamento 9 - 2,0 g L^{-1} NH_4NO_3) na redução da tensão interfacial óleo-água. As mensurações foram feitas utilizando hexadecano como fase leve.

3.6. *Experimentos de recuperação de petróleo residual*

A injeção do sobrenadante sem células proporcionou uma recuperação de 53% do óleo residual, 13% a mais que o tratamento com a solução de biossurfactante e com uma concentração dez vezes menor da molécula. Esse fato sugere que a bactéria é capaz de produzir outros compostos capazes de agir sinergisticamente com o biossurfactante, promovendo maior mobilização do óleo, apesar de nenhum composto em potencial ter sido identificado nesse trabalho.

A utilização do tratamento composto pelo sobrenadante e o polímero produzido pela bactéria apresentou um acréscimo de apenas 3% na recuperação do óleo em comparação com o tratamento composto somente pelo sobrenadante. Porém, a utilização do polímero reduziu em quase 50% o volume de sobrenadante necessário para a mobilização do óleo, sendo que quase a totalidade dos 56% de óleo residual recuperado nesse tratamento foram obtidos com a injeção de apenas dois volumes de poro da coluna, em comparação com os quatro volumes de poro utilizados anteriormente. O que demonstra o grande potencial dessa metodologia de MEOR para a recuperação avançada de petróleo. Uma grande vantagem atribuída a essa metodologia é que após o crescimento e eliminação das células, não é necessária mais nenhuma intervenção na solução surfactante a ser injetada, o que reduz os custos de sua produção. Além disso, o processo de recuperação não depende de nenhuma variável biológica, tornando mais fácil a compreensão dos resultados obtidos.

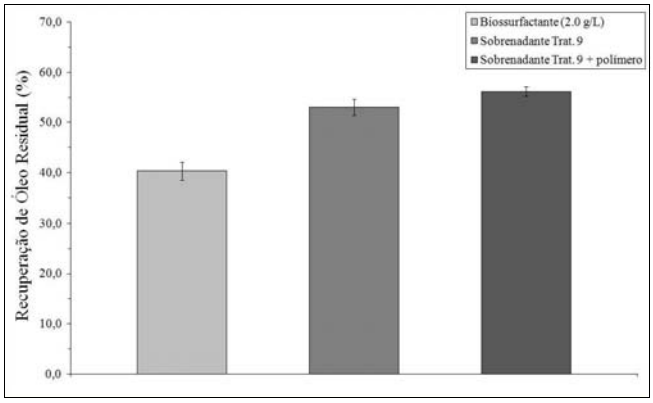

Figura 10. Recuperação de óleo residual por meio da utilização de uma solução e biossurfactante parcialmente purificada, o sobrenadante da cultura do isolado RI4914 (Tratamento 9 - 2,0 g L^{-1} NH_4NO_3) e o sobrenadante da cultura + polímero produzido pela própria bactéria.

4. Conclusões

Neste trabalho foram realizados experimentos com o intuito de avaliar-se a capacidade do biossurfactante produzido pelo isolado *Bacillus subtilis* RI4914 em reduzir a tensão interfacial e promover a recuperação de óleo residual em colunas empacotas com areia. Foi observado que a solução de biossurfactante é capaz de mobilizar até 40% do óleo residual das colunas, porém somente em concentrações elevadas (2 g L^{-1}). Por outro lado, a utilização do sobrenadante da cultura do Isolado RI4914 proporcionou recuperação de óleo superior à alcançada com a solução do biossurfactante e em uma concentração dez vezes menor da molécula. Tais resultados indicam a produção de compostos capazes de atuar sinergisticamente com o biossurfactante na redução da tensão interfacial, alcançando valores de até 0,07 mN/m. Além disso, destaca-se a produção espontânea de polímero pela bactéria, molécula esta capaz de aumentar a viscosidade do sobrenadante e reduzir quase que pela metade o volume necessário para uma recuperação satisfatória de óleo residual.

A obtenção de tensões interfacial ultra-baixas utilizando baixas concentrações de biossurfactante somada à produção de polímero pela bactéria e a determinação da salinidade ideal trazem excelentes perspectivas para a continuidade dos experimentos de recuperação de óleo, já que esses resultados apontam para um método barato e eficiente de MEOR.

5. Referências Bibliográficas

1. **Adkins, J. P., R. S. Tanner, E. O. Udegbunam, M. J. McInerney e R. M. Knapp.** 1992. Microbially enhanced oil recovery from unconsolidated limestone cores. Geomicrobiol. J.**10**: 77–86.

2. **Banat, I.M.** 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation - a review. Bioresour. Technol. **51**: 1–12.

3. **Banat, I.M., R.S. Makkare, S.S. Cameotra.** 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants.Appl. Microbiol. Biotechnol.**53**: 495–508.

4. **Belyaev S.S., I.A. Borzenkov, T.N. Nazina, E.P. Rozanova, I.F. Glumove R.R. Ibatullin.** 2004. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery Microbiol (MaikNauka Interperiodica). **73**: 590–598.

5. **Brown, L., A.A. Vadiee Stephens, J.O.** 2002. Slowing production declineand extending the economic life of an oil field: New MEORtechnology. SPE Reserv. Eval. Eng.**5**:33–41.

6. **Brown, L.R.** 2010. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). Current Opinion in Microbiology. **13**:316–320.

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

8. **Holzwarth, G.** 1985. Xanthan and scleroglucan: structure and use in enhanced oil recovery. Dev. Ind. Microbiol.**26**: 271–280.

9. **Li, Q., C. Kang, H. Wang, C. Liu, e C. Zhang.** 2000. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oil field Biochem. Eng. J. **11**: 197–199.

10. **Lundquist, A. D., D. Cheney, C. L. Powell, P. O'Neill, G. Norton, A. M. Veneman, N. Y. Evans, S. Mineta, S. Abraham, J. M. Allbaugh, C. T. Whitman, J. B. Bolten, M. E. Daniels, L. B. Lindsey e R. Barrales.** 2001. Energy for a new century: increasing domestic energy production. National energy policy report of the National Energy Policy Development Group. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

11. **Maneerat, S.** 2005. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin J. Sci. Technol. **27**: 675–683.

12. **Maudgalya, S., R. M. Knapp, M. J.McInerney**. 2007. Microbial enhanced oil recovery technologies: a review of the past, present, and future. SPE Production and Operations Symposium; Oklahoma City, OK.

13. **McInerney, M. J., D.P. Nagle, e R. Knapp, M. Folmsbee.** 2005. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future, p. 215–237. *In* B. Ollivier and M. Magot (ed.), Petroleum microbiology. ASM Press, Washington DC.

14. **Mukherjee, S., P. Das e R. Sem.** 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol.**24**: 509–515.

15. **Nakano, M. M., Y. P. Dailly, P. Zuber e D. P. Clark.** 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth in *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for the growth. J. Bacteriol. **179**: 6749–6755.

16. **Nitschke, M. e G. Pastore**. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Biores. Technol.**97**: 336–341.

17. **Nitschke, M., S.G.V.A. Costa, R. Haddad, L.A.G. Gonçalves, M.N.E Berlin e J. Contiero.** 2005. Oil wastes as unconventionalsubstrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Biotechnol. Prog. **21**: 1562–1566.

18. **Okpokwasili, G.C. e A.A. Ibiene.** 2006. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. African Journal of Biotechnology. **5**: 453–456.

19. **Ramos, H. U., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser e D. Jahn.** 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression. J. Bacteriol. **182**: 3072–3080.

20. **Sharma, M. K., D.O. Shah.** 1989. Use of surfactants in oil recovery, p. 253–315.*In*E. C. Donaldson e G. V. Chilingarian, Enhanced oil recovery II process and operations. The Fu Yen (ed), Elsevier, New York.

21. **Udegbunam, E. O., J. P. Adkins, R. M. Knapp, e M. J. McInerney.** 1991. Assessing the Effects of Microbial Metabolismand Metabolites on Reservoir Pore Structure.SPE 22846. Proceedings of SPE annual Technical Conference and Exhibition. Society of Petroleum Engineers, Richardson, TX.

22. **Updegraff, D.** 1983.Plugging and penetration of petroleumreservoir by microorganisms.*In*Proceedings of the International Conference on Microbial Enhancement of Oil Recovery, p.80–85.

23. **Van Hamme J. D., A. Singh e O.P. Ward.** 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev.**67**: 503–549.

24. **Youssef, N. H., D.R. Simpson, K.E. Duncan, M.J. McInerney, M. Folmsbee, T. Fincher, e R.M. Knapp.**2007. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. Appl. Environ. Microbiol.**73**: 1239–1247.

25. **Youssef, N. H., K. E., Duncan, D. P., Nagle, K. N., Savage, R. M., Knapp e M. J. McInerney**. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J. Microbiol. Methods.**56**: 339–347.

Capítulo 3

Caracterização físico-química do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* RI4914

1. Introdução

O petróleo é considerado, atualmente, uma fonte de energia indispensável, que move a industrialização e o crescimento econômico mundial. Globalmente, 1 trilhão de barris de petróleo têm sido recuperados de um total de 2 a 4 trilhões de barris (Hall et al., 2003), e, em muitos países altamente industrializados com os Estados Unidos, a produção doméstica de óleo está em declínio, sendo a probabilidade do descobrimento de grandes novas reservas considerada baixa (McInerney et al., 2005).

As tecnologias atuais de exploração de petróleo, em sua maior parte, são baseadas em métodos dependentes do fluxo natural de óleo por diferença de pressão e da injeção de gás ou água no interior do reservatório de forma a impulsionar o petróleo para os poços produtores (Van Hamme et al., 2003; Belyaev et. al., 2004). Essas tecnologias possibilitam, em geral, a mobilização de apenas 30 a 50% do óleo contido nos reservatórios (Lundquistet. al., 2001), sendo essa baixa recuperação atribuída a diversos fatores, mas principalmente à alta viscosidade do óleo presente nas jazidas e à alta tensão interfacial entre este e a água.

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de adiar ou reduzir o declínio na produção de petróleo e, ao mesmo tempo, aumentar as reservas exploráveis. Essas tecnologias incluem a utilização de métodos sofisticados, denominados recuperação melhorada de petróleo (enhanced oil recovery – EOR), que possuem a finalidade de aumentar a produção de óleo por meio do aumentando sua mobilidade no reservatório. Dentre os métodos de EOR, destaca-se a utilização de surfactantes, que são compostos com atividade de superfície capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial na interface entre líquidos, sólidos e gases, permitindo que estes dispersem como emulsão em água ou outros líquidos (Banat, 1995a). Ao reduzir a tensão interfacial óleo-água, os surfactantes promovem a redução das forças capilares que previnem a movimentação do petróleo nos poros da rocha, proporcionando sua recuperação.

Quase todos os surfactantes atualmente em uso são compostos derivados de petróleo, no entanto, o interesse por surfactantes de origem microbiana tem crescido constantemente nos últimos anos, uma vez que os biossurfactantes possuem inúmeras vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos, incluindo baixo nível de toxicidade (Lima et al., 2011), alta biodegradabilidade (Lima et al., 2010), melhor compatibilidade ambiental (Georgiou et al., 1992; Banat, 1995b) e alta atividade específica sob temperaturas, níveis de pH e salinidade extremos (Kretschner et al., 1982).

Os biossurfactantes são metabólitos ativos em superfície produzidos por microrganismos em crescimento em meio contendo compostos hidrossolúveis ou óleo (Mukherjee et al., 2006), e que possuem as mesmas propriedades tensoativas atribuídas aos surfactantes sintéticos (Banat et al., 2000). Baseando-se na massa molecular, os biossurfactantes são geralmente classificados em dois grupos: (1) biossurfactantes de baixo peso molecular como glicolipídeos, lipopeptídeos e fosfolipídeos; (2) biossurfactantes com alto peso molecular como emulsans, polissacarídeos e complexos de proteínas (Desai e Banat, 1997; Rosenberg e Ron, 1999; Ron e Rosenberg, 2001).

Em nossos trabalhos recentes o isolado *Bacillus subtilis* RI4914 foi caracterizado como produtor de um biossurfactante cujo sobrenadante da cultura foi capaz produzir tensões interfaciais óleo-água ultra-baixas, da ordem de 0,07 mN/m. A injeção desse sobrenadante em colunas de areia foi capaz de mobilizar mais de 60% do petróleo residual contido nestas e, além disso, reduzir pela metade o volume de água produzido no efluente da coluna. Os resultados obtidos são expressivos do ponto de vista de recuperação de petróleo, porém, mais trabalhos devem ser realizados no sentido de elucidar com fineza as propriedades apresentadas pelo biossurfactante. Esses dados serão importantes, por exemplo, para a realização de futuros testes de adsorção da molécula surfactante ou na geração de modelos matemáticos, sendo essas etapas fundamentais para a construção de uma metodologia com potencial para ser utilizada em larga escala.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi promover a caracterização físico-química da molécula biossurfactante produzida pelo isolado *Bacillus subtilis* RI4914.

2. Material e Métodos

2.1. Isolado bacteriano

A bactéria utilizada nos experimentos foi o isolado *Bacillus subtilis* RI4914, pertencente à coleção de isolados do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), Departamento de Microbiologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais). Essa bactéria foi isolada a partir de água de produção da formação Rio-Itaúnas, Conceição da Barra-ES. O isolado foi mantido em meio TSA e congelado a -80 ºC.

2.2. Produção e purificação do biossurfactante

Para a preparação do inoculo, a bactéria foi crescida por 18 horas a 30 ºC e agitação de 200 rpm, em meio MM com a seguinte composição (g L^{-1}): Sacarose (20,0), K_2HPO_4 (13,9), KH_2PO_4 (2,7), NH_4NO_3 (2,0) e 50 mL da solução de elementos traço (EDTA (0,5), $MgSO_4$ (3,0), $MnSO_4$. H_2O (0,5), NaCl (1,0), $CaCl_2$. $_2H_2O$ (0,1), $CoCl_2$. $6H_2O$ (0,1), $ZnSO_4$. $7H_2O$ (0,1), $FeSO_4$. $7H_2O$ (0,1), $CuSO_4$. $5H_2O$ (0,01), Na_2MoO_4 . $2H_2O$ (0,01), $NaSeO_4$ (0,01), $NaWoO_4$. $_2H_2O$ (0,01), $NiCl_2$ (0,02)). Após esse período as células foram transferidas a 1% para um erlenmeyer de 2 L contendo 1 L do mesmo meio. A cultura foi crescida por 7 dias a 30 ºC e agitação de 200 rpm.

Após o período de incubação as células foram removidas por centrifugação a 4 ºC e 10.000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi tratado com HCl até pH 2,0 e mantido a 4 ºC *overnight* para a completa precipitação do biossurfactante. A solução foi novamente centrifugada a 4 ºC e 10.000 xg por 15 minutos e o pellet dissolvido em solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}. O pH da solução foi então corrigido para 7,0 com HCl 0,1 mol L^{-1}.

2.3. Caracterização Físico-Química do Biossurfactante

2.3.1. Efeito da concentração do biossurfactante, concentração de NaCl e pH na redução da tensão interfacial óleo-água

Para a mensuração das tensões interfaciais entre o petróleo e as soluções surfactantes foi utilizado um tensiômetro *Spinning drop* Krúss, modelo Site100HS. Após o preenchimento do capilar do aparelho com as soluções surfactantes sob teste, uma gota de 10 μL de petróleo foi introduzida por meio da utilização de uma seringa. As leituras foram procedidas em rotação de 4.000 rpm e temperatura de 35 ºC.

Para se avaliar o efeito da concentração do biossurfactante na tensão interfacial foram preparadas soluções aquosas do biossurfactante nas concentrações de0,2, 0,4, 0,8, 1,2 e 2 g L^{-1}. O efeito da salinidade da solução surfactante na tensão interfacial foi testado por meio do preparo de soluções aquosas do biossurfactante (1,2 g L^{-1}) apresentando concentrações de NaCl de 2, 4, 6 e 8% (p/v). Para se avaliar o efeito do pH da solução surfactante na tensão interfacial o pH das soluções do biossurfactante (1,2 g L^{-1}) foi ajustado para os valores de 5, 6, 7, 8 e 9. As tensões interfaciais entre o petróleo e as amostras descritas acima foram mensuradas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, sendo a tensão interfacial real aquela obtida após alcançar-se a estabilidade dos valores mensurados.

2.3.2. Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC do biossurfactante purificado será estimada pela medição da tensão interfacial pelo método do anel de du Nouy (Cooper et al., 1979). As diluições do biossurfactante serão preparadas em água MilliQ®, sendo a tensão interfacial dessas diluições quantificada em tensiômetro Dataphysics modelo DCAT-11. A CMC será estimada após a elaboração do gráfico de tensão interfacial versus diluição do biossurfactante, como o recíproco da diluição micelar crítica, na qual a tensão interfacial começa a aumentar (Cooper et al., 1979).

2.3.3. Análises em HPLC

A quantificação do biossurfactante foi procedida por meio da utilização de um HPLC DIONEX modelo Ultimate 3000, equipado com coluna C18 fase reversa (Merck®, Alemanha) e detector SPD-10Ai UV-VIS. A fase móvel foi composta de acetonitrila 80% (v/v) e ácido trifluoroacético 0,1% (v/v), sendo utilizada de maneira isocromática a um fluxo de 1 mL min-1. Foram injetados 20 µL de amostra para cada análise. O composto foi identificado e quantificado, respectivamente, pela comparação do tempo de retenção e da área dos picos formados com aqueles formados pelo padrão de surfactina (Sigma-S3523)

2.3.4. Atividade de Emulsificação e Estabilidade da Emulsão

A avaliação da capacidade de emulsificação de querosene foi realizada utilizando-se o biossurfactante semi-purificado e segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Quatro mililitros da solução do biossurfactante a uma concentração de 0,4 g L^{-1} foram misturados a 4 mL do hidrocarboneto em um tubo de vidro de 100 mm X 15 mm. O índice de emulsificação E_{24} foi determinado calculando-se o volume da camada emulsionada (mm^2), dividindo-se a mesma pelo volume total do líquido e multiplicando-se o valor obtido por 100. A emulsão foi considerada estável se seu volume, 24 horas após a sua formação, correspondeu a 50 % ou mais do seu volume original.

As emulsões formadas pelos biossurfactantes foram comparadas às formadas pelo surfactante sintético SDS®, nas mesmas condições. As avaliações foram realizadas em três repetições.

2.3.4.1. Determinação do efeito da concentração do biossurfactante, concentração de NaCl e pH

A capacidade emulsificante do biossurfactante foi avaliada utilizando cinco diferentes concentrações da molécula, sendo estas 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,2 L^{-1}. O índice E_{24} foi calculado conforme descrito.

Para se avaliar o efeito da salinidade na capacidade emulsificante do biossurfactante, este foi dissolvido em água deionizada contendo NaCl nas concentração de 0, 2, 4, 6 e 8 % (p/v), seguindo-se avaliação do índice de emulsificação E_{24}. O efeito

do pH foi determinado por meio da alteração do pH das soluções de biossurfactante para os valores de 5, 6, 7, 8 e 9, segundo o protocolo de Ilori et al. (2005), sendo qualquer precipitação removida antes da realização do ensaio de emulsificação. A concentração de biossurfactante utilizada nos dois experimentos descritos anteriormente foi de 0,4 g L^{-1}.

2.3.4.2. Determinação do efeito da temperatura

Foi avaliado o efeito da exposição a diferentes temperaturas na capacidade emulsificante de uma solução de biossurfactante a uma concentração de 0,4 g L^{-1}. Soluções do composto foram mantidas por 24 horas sob as temperaturas de 30, 40, 60 e 80 °C, resfriadas a 30 ºC e utilizadas para a determinação do índice E_{24}.

2.3.5. Estabilidade térmica do biossurfactante

Para se avaliar a estabilidade térmica da molécula do biossurfactante, foi preparada uma solução do composto na concentração correspondente a sua CMC. A solução foi mantida a uma temperatura de 90 ºC por 180 min, sendo sua tensão superficial mensurada em intervalos de 30 min. A elevação da tensão superficial, nesse caso, representaria indícios de degradação das moléculas surfactantes.

2.4. Análise Estatística

Todos os experimentos foram montados no delineamento inteiramente casualizado e os resultados de cada experimento analisados por ANOVA, pelo teste F, a 5% de probabilidade. Posteriormente foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para os dados dependentes de efeito qualitativo. Os dados dependentes de efeito quantitativo foram avaliados por regressão. As análises foram feitas por meio da utilização do software Sigmaplot, versão 12.0.0.182 (SPSS Inc., UK).

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito da concentração do biossurfactante, concentração de NaCl e pH na redução da tensão interfacial óleo-água

O efeito da concentração do biossurfactante na tensão interfacial óleo-água pôde ser explicado por uma equação polinomial do 2º grau, onde o aumento da concentração da molécula resultou no decréscimo da tensão (Figura 4A). Foi observada uma redução da tensão interfacial de 43 mN/m para valores inferiores a 1,3 mN/m. Dentre as concentrações de biossurfactante testadas, pôde-se observar a redução da tensão interfacial de 3,8 mN/m na presença de 0,2 g L^{-1} da molécula para 1,2 mN/m, quando essa concentração foi elevada para 2g L^{-1}. A adição de biossurfactante em uma concentração acima de 1,2 g L^{-1}não resultou em uma maior redução da tensão, o que pode significar, em teoria, que o valor de tensão interfacial obtido nesta condição estaria próximo do valor mínimo capaz de ser alcançado por essa molécula surfactante. Dever ser ressaltado, no entanto, que a condição aqui testada não inclui a utilização de nenhum co-surfactante ou sal capaz de promover um aumento de atividade do biossurfactante.

A adição de NaCl à solução de biossurfactante promoveu uma redução exponencial da tensão interfacial óleo-água (Figura 4B). A tensão foi reduzida de aproximadamente 1,4 mN/m, na ausência de NaCl, para 0,06 mN/m quando o sal foi adicionado em uma concentração de 8% (p/v). Essa tensão interfacial obtida pode ser considerada ultra-baixa e suficiente para reduzir significativamente as forças capilares que previnem a movimentação do petróleo em sistemas porosos, atestando o potencial do biossurfactante para a utilização em processos de recuperação de melhorada de petróleo.

Segundo Sharma e Shah (1989), a tensão interfacial é um parâmetro altamente dependente da salinidade da fase aquosa. Alterando-se a salinidade da fase aquosa pode-se alterar significativamente a solubilidade relativa do surfactante, o que levará a uma alteração do coeficiente de partição da molécula entre as duas fases. O aumento da concentração salina da fase aquosa promove a migração das moléculas surfactantes para a fase oleosa e, conseqüentemente, a redução da concentração do surfactante na fase aquosa. De maneira oposta, a redução da concentração salina na fase aquosa leva a um acúmulo de grande parte do surfactante nessa fase e, consequentemente, a redução da concentração dessas moléculas na fase oleosa. De acordo com os autores, a concentração ótima de sal é

aquela capaz de promover o equilíbrio da distribuição do surfactante entre as fases aquosa e oleosa, o que leva a um acúmulo da molécula na interface das fases, culminando na geração de uma tensão interfacial ultra-baixa. Porém, o aumento da concentração salina para valores acima da concentração ótima levam novamente ao aumento da tensão interfacial.

Esses fatos levam a crer que a maior concentração salina avaliada neste trabalho se aproxima, porém, não ultrapassa a concentração ótima para o biossurfactante sob teste, uma vez que não foi observado aumento da tensão interfacial. Esse dado pode ser considerado relevante do ponto de vista operacional, já que grande parte da água utilizada para a recuperação de petróleo apresenta valores de concentração salina próximosa 8% de NaCl. Esse fato muitas vezes impede a utilização de surfactantes sintéticos, uma vez que estes apresentem valores de concentrações salinas ótimas muito inferiores às mencionadas.

O efeito do pH na tensão interfacial foi bastante pronunciado principalmente em baixos valores. Assim como relatado anteriormente, em pHs baixos as moléculas do biossurfactante tendem a sair de solução, o que provocou, neste caso, uma elevação brusca da tensão interfacial óleo-água (Figura 4C). Nos demais tratamentos testados, porém, não pôde ser observada nenhuma tendência significativa relativa ao aumento ou redução da atividade do biossurfactante em relação ao aumento do pH, sendo notada uma certa estabilidade nos valores de tensão. Pôde ser notado apenas um pequeno aumento de tensão interfacial quando comparados os tratamentos com pHs 8,0 e 9,0 com o tratamento com pH 7,0. Análises preliminares indicam que o biossurfactante em questão é uma surfactina (dados não mostrados), logo, essa variação pode ser explicada pela desprotonação dos radicais glutamil e asparagil em pH neutro, o que leva à geração de duas cargas negativas na molécula. A presença dessas cargas torna a molécula de surfactina menos hidrofobia e, além disso, causa uma alteração conformacional na molécula capaz de alterar suas propriedades de superfície (Shen et al., 2011).

Assim como relatado para o experimento de emulsificação, pode-se dizer que as moléculas do biossurfactante apresentaram estabilidade em condições de pH entre 6,0 e 9,0, apresentando potencial para sua utilização em processos de recuperação de petróleo que apresentem tais condições.

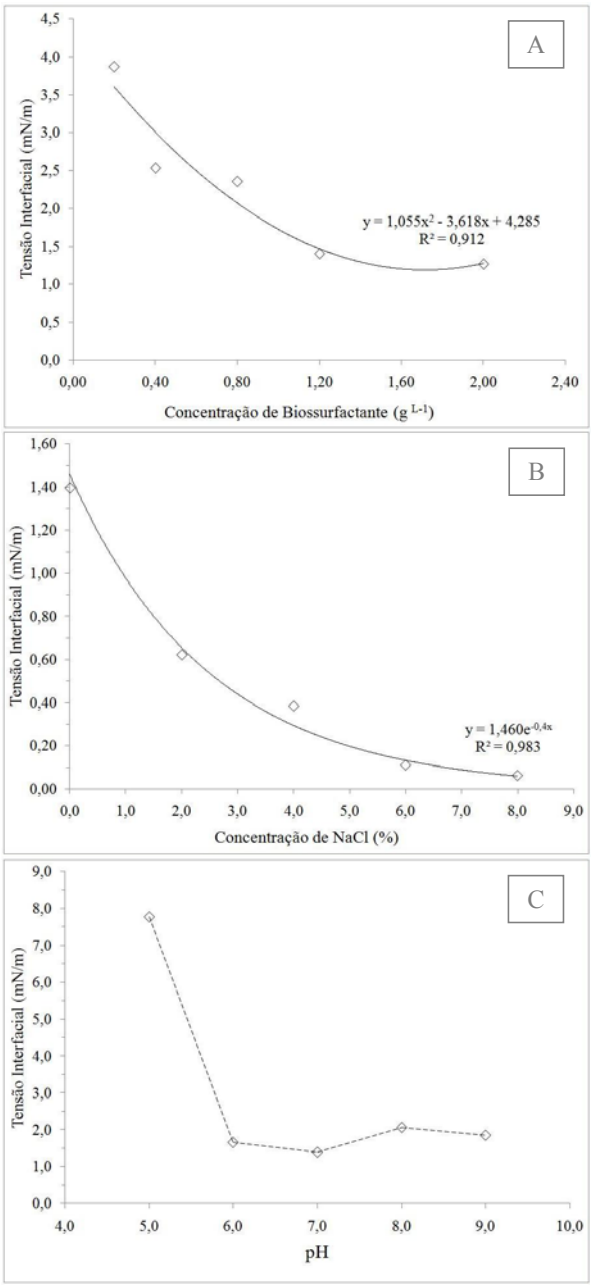

Figura 4. Efeito da concentração do biossurfactante (A), da concentração de NaCl (B) e do pH (C) na redução da tensão interfacial óleo-água.

3.2. *Concentração Micelar Crítica (CMC)*

O valor de CMC do biossurfactante RI4914, obtido após a elaboração do gráfico de tensão interfacial versus concentração da molécula, foi de aproximadamente 200 mg L^{-1}(Figura 5), sendo assim considerado como valor de CMC de um biossurfactante de alta eficiência (Mulligan e Gibbs, 1993). A CMC do biossurfactante produzido pelo isolado RI4914 é diferente daquela regularmente reportada para a surfactina, que gira em torno de 20 mg L^{-1}, porém é condizente com a CMC obtida por Lima (2008) para a surfactina produzida pelo isolado LBBMA 155, que foi de 180 mg L^{-1}. Ressalta-se que as CMCs dos biossurfactantes apresentadas nesse trabalho e por Lima (2008) foram obtidas em soluções preparadas em água milli-Q®, ou seja, na ausência total de qualquer íon que pudesse influenciar na estabilidade das micelas. Segundo Li et al. (2009), a presença de íons sódio na solução de surfactina é capaz de reduzir o valor de CMC do surfactante. Isso ocorre porque o sódio se liga às micelas e inibe as forças de repulsão entre as cargas negativas das moléculas de surfactina, o que favorece a agregação das mesmas em uma menor concentração.

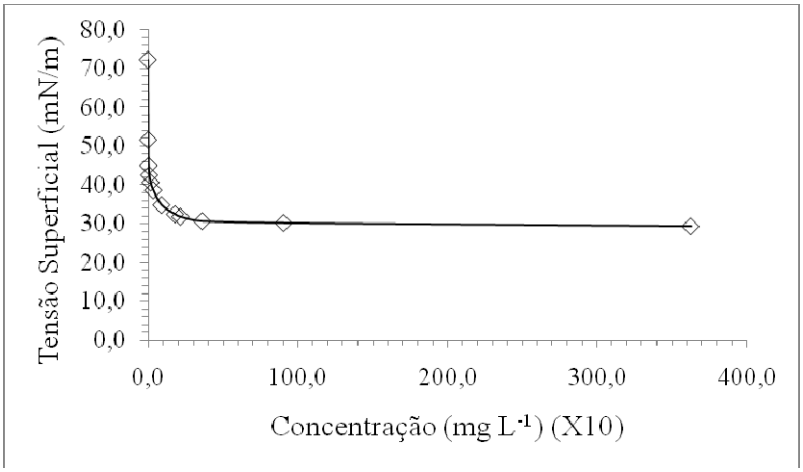

Figura 5. Determinação da CMC do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* RI4914.

3.3. *Atividade de Emulsificação e Estabilidade da Emulsão*

3.3.1. Efeito da Concentração do biossurfactante

Em todas as concentrações testadas o biossurfactante foi capaz de formar emulsão estável com o querosene, sendo que, o volume de emulsão formada em função da concentração da moléculapôde ser explicado por uma equação polinomial do 2º grau (Figura 6). O volume de emulsão formado elevou-se à medida que foi elevada a concentração de biossurfactante, atingindo seu ponto máximo em 0,6 g L^{-1}do composto. O aumento na concentração da molécula para 1,0 g L^{-1} não provocou o aumento do volume de emulsão formada, demonstrando que 71,0% é o valor aproximado máximo de emulsão estável capaz de ser formada pelo biossurfactante nas condições testadas neste experimento. Os valores máximos de emulsificação com querosene obtidos nesse trabalho foram superiores aos obtidos por Wei et al. (2004) em concentrações similares. Esses autores obtiveram somente em torno de 29,0% de emulsão estável com a utilização de uma solução que apresentava 1,0 g L^{-1} de surfactina. No entanto, a utilização por parte desses autores de todo o sobrenadante da cultura para os ensaios de emulsificação, ao

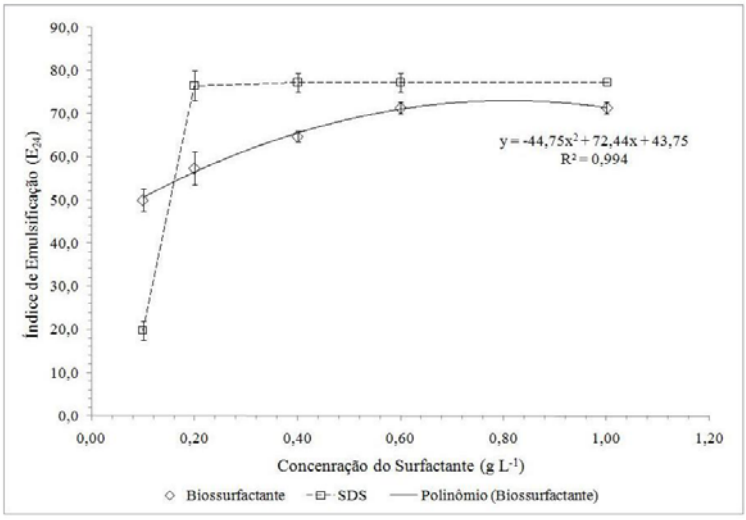

Figura 6. Efeito da concentração do biossurfactante e do surfactante sintético SDS no índice de emulsificação E_{24} em querosene.

invés de uma solução parcialmente purificada, e ainda uma razão de querosene/ solução surfactante de 1:0,66 ao invés de 1:1 (neste experimento), podem explicar tais diferenças.

O volume máximo de emulsão estável obtido com o biossurfactante (71,42%), neste trabalho, pode ser considerado satisfatório quando comparado com o obtido com o surfactante sintético SDS, que foi de 77, 31%. Porém, nenhum modelo pôde explicar o volume de emulsão formada em função da concentração desse surfactante. O volume de emulsão formado pelo SDS foi de apenas 19,88% quando a concentração de surfactante utilizada foi de 0,1g L^{-1}, porém, esse volume elevou-se para seu valor máximo quando a concentração foi aumentada para 0,2 g L^{-1}.

3.3.2. Efeito da Concentração de NaCl

O efeito da concentração de NaCl na capacidade emulsificante do biossurfactante pôde ser explicado por uma equação polinomial do 2º grau, onde o volume de emulsão estável formada reduz com o aumento da concentração do sal (Figura 7). Ressalta-se ainda que as emulsões formadas nas concentrações de 6 e 8% de NaCl não foram estáveis, uma vez que não satisfizeram o pré-requisito de manter 50% ou mais de estabilidade após 24 horas. O surfactante SDS também apresentou redução de sua capacidade emulsificante na presença de NaCl, sendo essa tendência explicada também por uma equação polinomial do 2º grau, porém positiva, o que significa que nem sempre o aumento da concentração de sal resultou no decréscimo do volume de emulsão formada. Ao contrário do que ocorreu para o biossurfactante, o volume de emulsão estável formada pelo SDS decresceu até a concentração de 4% de NaCl mas voltou a apresentar uma tendência de aumento quando as concentrações de sal foram elevadas de 6 e 8% (Figura 7).

Como já relatado anteriormente, alterando-se a salinidade da fase aquosa pode-se alterar o coeficiente de partição da molécula entre as duas fases, de forma que o aumento da concentração de NaCl possivelmente fez com que tanto o biossurfactante quanto o SDS migrassem para o querosene utilizado como fonte hidrofóbica nesse experimento. Ao migrar para o querosene, obrigatoriamente as micelas dos surfactantes, se existentes, estarão presentes de maneira inversa à encontrada em solução aquosa, ou seja, com a parte polar voltada para o centro da micela e a parte apolar voltada para o solvente. Neste caso, a formação de emulsão também ocorre de maneira inversa, sendo obtida uma emulsão água em óleo ao invés de uma emulsão óleo em água como ocorre normalmente. Na emulsão água em óleo, gotículas de água se encontram emulsificadas em um filme contínuo de óleo.

A capacidade do SDS em estabilizar emulsões em altas concentrações de NaCl pode estar relacionada com a habilidade da molécula em formar micelas invertidas e consequentemente emulsões água em óleo. Já o biossurfactante parece não possuir a habilidade de formar micelas invertidas, uma vez que não foi capaz de formar emulsão estável com querosene em concentrações de NaCl superiores a 4%. Três fatores dão suporte a essa hipótese: (1) os dados de tensão interfacial versus concentração de NaCl apresentados anteriormente (Figura 4B) comprovam que o biossurfactante apresenta alta atividade em concentrações de sal superiores a 4%, o que descarta a hipótese de desestabilização da molécula; (2) a surfactina apresenta um grupo polar formado por 7 resíduos de aminoácidos, grupo este que pode ser grande demais para ser acomodado em grande número no centro de uma micela; e (3) a molécula de surfactina não foi evolutivamente selecionada para a formação de micelas invertidas em solventes apolares, uma vez que as bactérias produtoras tem que viver obrigatoriamente em fase aquosa. Contudo, mais experimentos devem ser conduzidos no intuito de comprovar essa hipótese.

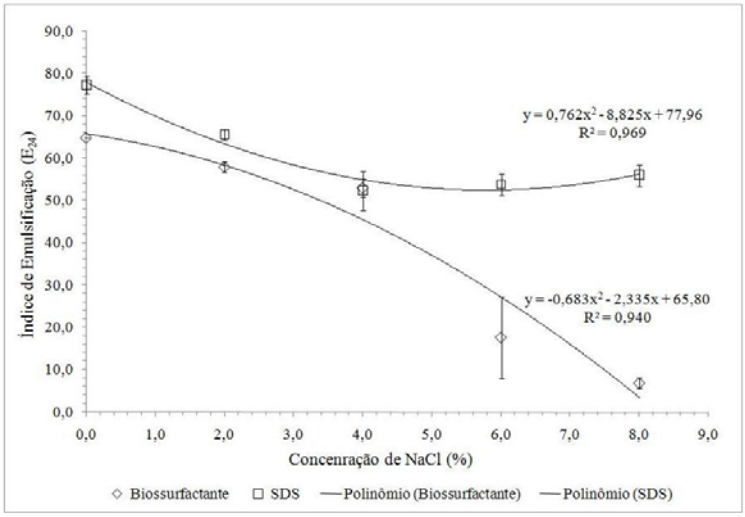

Figura 7. Efeito da concentração de NaCl no índice de emulsificação E_{24} do biossurfactante e do surfactante sintético SDS em querosene, ambos em uma concentração de 0,4 g L^{-1}.

3.3.3. Efeito do pH

O biossurfactante foi capaz de formar emulsão estável em todos os pHs testados, porém, foi avaliada uma redução significativa no volume de emulsão formada em pH 5,0 ($p < 0,001$) (Figura 8). O início do processo de precipitação das moléculas do biossurfactante em pHs abaixo de 5,0 pode explicar tal evento, uma vez que a solubilidade dessas moléculas é primordial para sua atividade. Nas demais condições testadas não foi observada nenhuma influência do pH na capacidade emulsificante do biossurfactante, sendo mensurados volumes emulsões estáveis em torno de 65,0%.Esse fato indica boa estabilidade do composto mediante condições ambientais adversas.

Comportamento diferente foi observado para o SDS, uma vez que a capacidade emulsificante do surfactante foi afetada pela acidificação da solução. Os volumes de emulsão estável mensurados nos pHs 5,0 e 6,0 foram estatisticamente inferiores ao volume mensurado em pH neutro ($p < 0,0141$) (Figura 8), o que indica perda de capacidade emulsificante do surfactante nessas condições. Nos demais pHs, nenhuma alteração foi observada na capacidade emulsificante da molécula, sendo mensurados volumes de emulsão em torno de 75,0%.

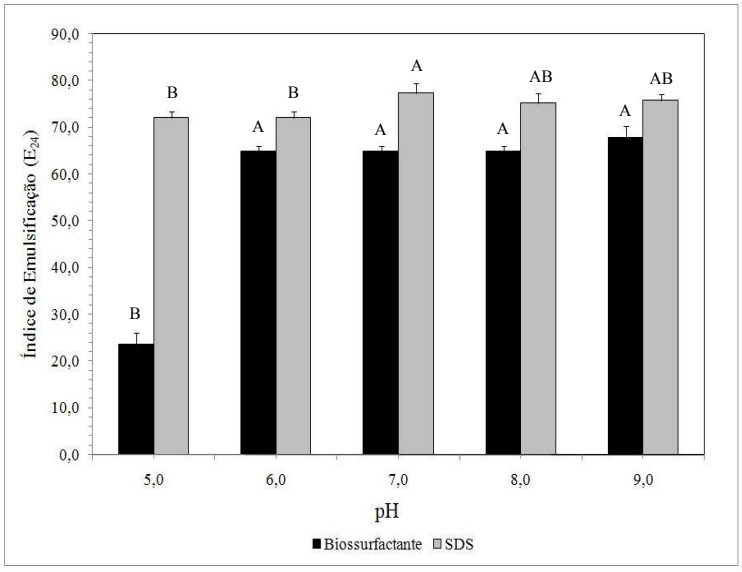

Figura 8. Efeito do pH no índice de emulsificação E_{24} do biossurfactante e do surfactante sintético SDS em querosene, ambos em uma concentração de 0,4 g L^{-1}. Barras referentes ao mesmo surfactante e com pelo menos uma letra em comum, não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

3.3.4. Efeito da Temperatura

Com o intuito de verificar o efeito da temperatura sobre a capacidade emulsificante do biossurfactante e do surfactante sintético SDS, soluções de ambos os compostos foram mantidas incubadas sob diferentes temperaturas por um período de 24 horas, sendo, após isso, utilizadas para o cálculo de índice de emulsificação E_{24} em querosene. A figura 9 mostra que a incubação do biossurfactante sob as temperaturas de 40, 60 e 80 ºC foi benéfica para formação de emulsão pela molécula, uma vez que os resultados obtidos nessas temperaturas foram significativamente superiores ao obtido na temperatura de 30 ºC ($p < 0,0011$). Os melhores resultados de emulsificação obtidos com o biossurfactante nesse experimento giraram em torno de 74,0%.

Quando comparado ao SDS, pode ser observado que o biossurfactante apresentou maior estabilidade térmica, uma fez que o surfactante sintético apresentou perda de capacidade emulsificante quando mantido em altas temperaturas. O volume de emulsão estável obtida com o SDS reduziu significativamente de 77 para 62% quando a temperatura de incubação da solução foi aumentada de 30 para 80 ºC ($p < 0,0051$) (Figura 9), indicando instabilidade da molécula sob tal condição.

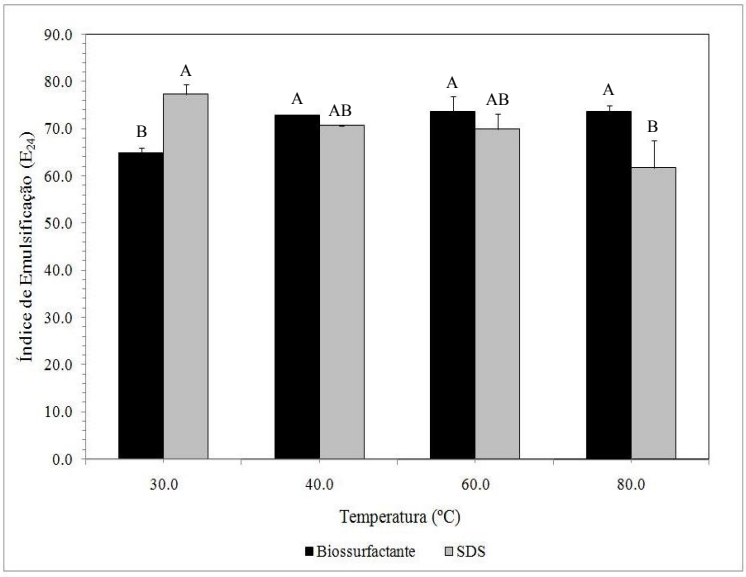

Figura 9. Efeito da temperatura no índice de emulsificação E_{24} do biossurfactante e do surfactante sintético SDS em querosene, ambos em uma concentração de 0,4 g L^{-1}. Barras referentes ao mesmo surfactante e com pelo menos uma letra em comum, não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

3.4. Estabilidade térmica do biossurfactante

O biossurfactante e o surfactante sintético SDS foram testados quanto à estabilidade térmica por meio da incubação sob temperatura de 90 ºC por 180 minutos. Os surfactantes foram incubados na concentração correspondente a sua CMC, sendo a tensão superficial inicial do biossurfactante e do SDS 31,62 e 33,84 mN/m, respectivamente (Figura 10). A elevação da tensão superficial seria, neste caso indício de degradação das moléculas, fato este que não ocorreu para nenhum dos surfactantes. Tanto o biossurfactante quanto SDS demonstraram se manter estáveis a uma temperatura de 90 ºC por pelo menos 180 minutos. No entanto, em condições mais severas como aquelas impostas quando da autoclavagem dos compostos, ou manutenção por tempo prolongado em altas temperaturas, pôde ser observada uma perda de atividade de superfície por parte do SDS, fenômeno não observado em relação ao biossurfactante (Dados não mostrados). A perda de atividade de superfície por parte do SDS pode estar relacionada à hidrólise da cadeia hidrocarbônica do surfactante, reação esta possível de acontecer sob tais condições (Pornsunthorntawee et al., 2008).

As características de estabilidade apresentadas pelo biossurfactante o qualificam para a utilização sob condições extremas como em processos de recuperação de petróleo.

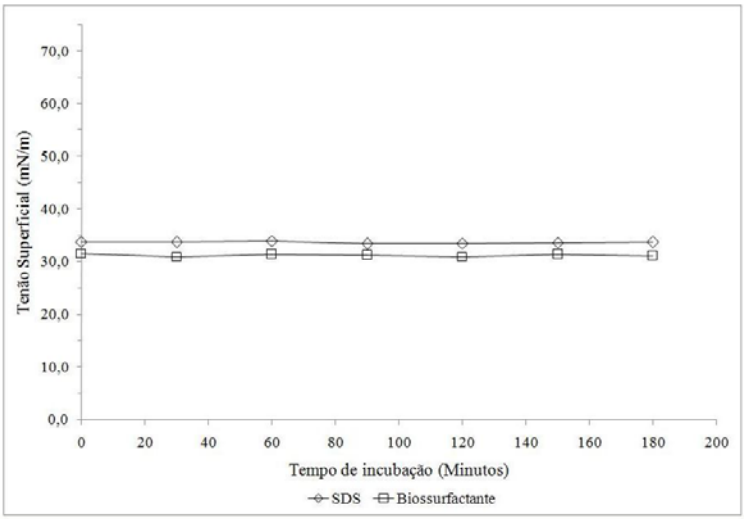

Figura 10. Estabilidade do biossurfactante comparada à do surfactante sintético SDS. Tensão superficial dos surfactantes após a incubação por 90 ºC por diferentes tempos.

4. Conclusões

O biossurfactante produzido pelo isolado *Bacillus subtilis* RI4914 apresentou características físico-químicas comparáveis às do surfactante sintético SDS. O biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água para 29,3 mN/m, com CMC calculada em 200,0 mg L^{-1}, enquanto o SDS foi capaz de reduzir essa tensão para 33, 0 mN/m, com CMC, segundo Pornsunthorntawee et al. (2008) de 1.280,0 mg L^{-1}. O biossurfactante ainda mostrou ser capaz de produzir tensões interfaciais água-óleo ultra-baixas, chegando a 0,06 mN/M em solução salina de 8% (p/v). Com relação à estabilização de emulsões, os surfactantes apresentaram valores máximos comparáveis, sendo 77,31% para o SDS e 73,66% para o biossurfactante. Em termos de estabilidade, o biossurfactante demonstrou ter sua atividade menos influenciada por condições extremas, principalmente no que se diz respeito às altas temperaturas. A exposição a temperaturas superiores a 100 ºC ou a manutenção em temperaturas elevadas por longos períodos de tempo demonstrou ser capaz de promover a desestabilização da molécula de SDS, com nítida perda de atividade de superfície.

Esses resultados comprovam que a putativa surfactina produzida pelo isolado *B. subtilis* RI4914 é um substituto em potencial para os surfactantes sintéticos frequentemente utilizados na indústria do petróleo, apresentando resultados de atividade interfacial comparáveis aos dos melhores surfactantes. O biossurfactante demonstrou ser capaz de atuar sob condições ambientais extremas, muitas vezes limitantes para os compostos sintéticos, e, acima de tudo, não tornar-se um novo contaminante para o ambiente.

5. Referências Bibliográficas

Arino, S., Marchal, R., Vandecasteele, J.P., 1996. Identification and production of a rhamnolipidbiosurfactant by a Pseudomonas species. Applied and Environmental Microbiology 45, 162-168.

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

Banat, I.M., 1995b. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art. Acta Biotechnologica 15, 251-267.

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

Belyaev S.S., Borzenkov, I.A., Nazina, T.N., Rozanova, E.P., Glumov, I.F. e Ibatullin, R.R., 2004. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery. Microbiology (Maik Nauka Interperiodica) 73, 590-598.

Bodour, A.A., Guerrero-Barajas, C., Jiorle, B.V., Malcomson, M.E., Paull, A.K., Somogyi, A., Trinh, L.N., Bates, R.B. e Maier, R.M., 2004.Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11.Applied and Environmental Microbiology 70, 114-120.

Cooper, D.J. & Goldenberg, B.G., 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology 54, 224-229.

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

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

Georgiou, G., Lim, S.C., Sharma, M.M., 1992. Surface-active compounds from microorganisms. Biotechnology 10, 60–65.

Hall, C., Tharakan, P., Hallock, J., Cleveland, C. e Jefferson, M., 2003. Hydrocarbons and the evolution of human culture. Nature 426, 318-322.

Kretschner, A., Bock, H., Wagnee, F., 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. Applied and Environmental Microbiology 44, 864-870.

Li, Y., Qiang, R. e Mu, B., 2009. Influence of sodium ions on micelles of surfactin-C16 in solution, Journal of Surfactants and Detergents 12, 31-36.

Lima, T.M.S., 2008. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. Tese de doutorado - Universidade Federal de Viçosa.

Lima, T.M.S., Procópio, Lorena C., Brandão, Felipe D., Carvalho, André M. X., Tótola, Marcos R., Borges, Arnaldo C.,2010. Biodegradability of bacterial surfactants. Biodegradation (Dordrecht) 22, 585-592.

Lima, T.M.S., Procópio, Lorena C., Brandão, Felipe D., Leão, Bruna A., Tótola, Marcos R., Borges, Arnaldo C., 2011. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. Bioresource Technology 102, 2957-2964.

Lundquist, A.D., Cheney, D., Powell, C.L., O'Neill, P., Norton, G.,Veneman, A.M., Evans, D.L., Mineta, N.Y., Abraham, S., Allbaugh, J.M., Whitman, C.T., Bolten, J.B., Daniels, M.E., Lindsey, L.B. e Barrales, R., 2001. Energy for a New Century: Increasing Domestic Energy Production. Nacional energy policy report of the Nacional Energy Policy Development Group.U.S. Government Printing Ofice, Washington, D.C.

McInerney, M. J., Nagle, D. P., and Knapp, R. M. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future, pp. 215-237. In: M. Magot and B. Ollivier, Petroleum Microbiology, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C., 2005.

Mukherjee, S., Das, P. e Sem, R., 2006.Towards commercial production of microbial surfactants.Trends in Biotechnology 24, 509-515.

Mulligan, C.N. &Gibbs, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants, pp. 392-371. In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York,1993.

Nitschke, M., 2004. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Campinas, Campinas, São Paulo.

O. Pornsunthorntawee, P. Wongpanit, S. Chavadej, M. Abe, and R. Rujiravanit, 2008. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil, Bioresource Technology 99, 1589-1595.

Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2001. Natural roles of biosurfactant. Environmental Microbiology 3, 229-236.

Rosenberg, E., Ron, E.Z., 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied and Environmental Microbiology 52, 154-162.

Sharma, M.K.; Shah, D.O. Use of Surfactants in Oil Recovery, pp. 253–315. In Enhanced OilRecovery II Processes and Operations, Erle, C. Donaldson, George V. Chilingarian, The Fu Yen, Eds.; Elsevier: New York, 1989.

Shen, H.H., Lin, T.W., Thomas, R.K., Taylor, D.J.F. e Penfold, J., 2011. Surfactin Structures at Interfaces and in Solution: The Effect of pH and Cations. Journal of Physical Chemistry 115, 4427-4435.

Van Hamme J.D., Singh, A. e Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67, 503-549.

Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N. & Cameotra, S.S., 2002. Matrixassisted laser desortion ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. Applied and Environmental Microbiology 68, 6210-6219.

Wei, Y., Wang, L. e Chang, J., 2004.Optimizing Iron Supplement Strategies for Enhanced Surfactin Production with *Bacillus subtilis*,
Biotechnology Progress20, 979-983.

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

Capítulo 4

Recuperação de Petróleo em meio poroso não consolidado e a influência de parâmetros ambientais

1. Introdução

As tecnologias atuais de exploração de petróleo, em sua maior parte, são baseadas em métodos dependentes do fluxo natural de óleo por diferença de pressão e da injeção de gás ou água no interior do reservatório de forma a impulsionar o petróleo para os poços produtores (Van Hammeet al.,2003, Belyaevet al., 2004). Essas tecnologias possibilitam, em geral, a mobilização de apenas 30 a 50% do óleo contido nos reservatórios (Lundquistet al., 2001), sendo essa baixa recuperação atribuída a diversos fatores, mas principalmente à alta viscosidade do óleo presente nas jazidas e à alta tensão interfacial entre este e a água.

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de adiar ou reduzir o declínio na produção de petróleo e, ao mesmo tempo, aumentar as reservas exploráveis. Essas tecnologias incluem a utilização de técnicas mais sofisticadas, denominadas técnicas de recuperação melhorada de petróleo (enhanced oil recovery – EOR), que possuem a finalidade de aumentar a produção de óleo por meio do aumentando sua mobilidade no reservatório (McInerneyet al., 2005).

Dentre as técnicas de EOR, aquelas baseadas na utilização de microrganismos (MEOR – Microbially Enhanced Oil Recovery) são consideradas como as mais promissoras para a utilização em larga escala, uma vez vários produtos microbianos de interesse podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo (Fox et al., 2000;Maneerat, 2005; Nitschke et al., 2005; Mukherjee et al., 2006; Nitschke e Pastore, 2006).

A produção de ácidos orgânicos pelos micro-organismos pode levar a dissolução de carbonatos na rocha fonte, aumentando assim a permeabilidade e a porosidade (Udegbunam et al., 1991; Adkins et al., 1992). Os solventes produzidos podem alterar a molhabilidade da interface óleo-rocha, liberando o óleo da matriz porosa. Os biossurfactantes, caracterizados como um grupo diverso de moléculas como glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (Mukherjee et al., 2006), possuem a propriedade intrínseca de reduzir a tensão na interface óleo-rocha e óleo-flúido de injeção, reduzindo as forças capilares que previnem a movimentação do óleo pelos poros da rocha (Banat et al., 2000). Muitos exopolímeros produzidos por diversas espécies bacterianas podem ser úteis na indústria do petróleo, principalmente como agentes de controle de mobilidade, onde aumentam a viscosidade do fluido de injeção e proporcionam maior recuperação de óleo. Um exemplo disso muito utilizado é a goma xantan (Holzwarth, 1985). Deve ser

ressaltado ainda que esses compostos microbianos de interesse para a indústria do petróleo possuem a capacidade de atuar sinergisticamente no aperfeiçoamento da recuperação de óleo. Por exemplo, Maudgalya e colaboradores (2004) reportam que para existir uma recuperação significativa de óleo residual de colunas de areia e cores de arenito são requeridos pelo menos três produtos: um polímero, um biossurfactante e um álcool.

Vários são os trabalhos de campo e laboratório que apresentam resultados positivos quanto à aplicação de técnicas de MEOR na recuperação de petróleo (Li et al., 2000;Brown e Vadiee Stephens, 2002; Maudgalya et al., 2007; Okpokwasili e Ibiene, 2006; Youssef et al., 2007), porém, a dúvida que permanece não é se os micro-organismos podem aumentar a recuperação de óleo, e sim como empregar essa habilidade em uma prática economicamente viável e de maneira cientificamente válida (Brown, 2010). Segundo Banat (1995), existem três principais estratégias para emprego da MEOR na recuperação de petróleo: (1) a produção dos compostos de interesse, em escalas industriais e *ex situ*, seguida da injeção destes no reservatório; (2) a adição de nutrientes selecionados ao reservatório, estimulando o crescimento da microbiota indígena capaz de produzir os compostos de interesse; (3) a injeção de uma cultura pré-selecionada dentro do reservatório, acompanhada da injeção de nutrientes que permitam seu crescimento e a produção dos compostos *in situ*.

A maior parte dos processos de MEOR, particularmente os métodos mais antigos, envolve a injeção de micro-organismos dentro do reservatório, no entanto, em alguns casos, esses micro-organismos causaram o entupimento dos poços, ou contribuíram para a corrosão dos equipamentos e dutos pela produção de sulfeto de hidrogênio. Tem sido sugerido que não somente as bactérias podem causar o entupimento dos poços, mas também produtos de seu metabolismo como, hidróxido de ferro (Updegraff, 1983). Outro problema enfrentado pela MEOR é que grande parte da literatura nesse contexto é baseada em dados laboratoriais, sendo difícil, se não impossível, utilizá-los para prever o que ocorrerá em campo, já que a performance microbiana em campo não é a mesma observada *in vitro* (Maudgalya et al., 2007). Devido a todos esses fatores poucos trabalhos apresentam análise pós-tratamento ou como os resultados foram calculados, ou ainda são capazes de explicar os mecanismos envolvidos na recuperação de óleo, o que ajuda a explicar porque a MEOR não ganhou ainda credibilidade na indústria do petróleo (Maudgalya et al., 2007).

A bioestimulação tem sido apontada como uma possível solução para os problemas envolvendo as técnicas de MEOR (Brown, 2010), uma vez que a literatura

mostra bons resultados envolvendo a utilização dessa técnica (Brown et al., 2002). Porém, isso ainda não elimina completamente os problemas, uma vez que seu sucesso dependeria da presença de micro-organismos capazes de produzir os compostos de interesse e ainda resistir à competição por parte dos demais. Além disso, tornar-se-ia quase impossível explicar quais seriam os mecanismos envolvidos na recuperação do óleo.

Uma solução definitiva para todos os problemas técnicos envolvendo a MEOR seria a produção dos compostos de interesse *ex situ* seguido da injeção dos mesmos no reservatório. Nesse processo todos os compostos seriam produzidos em escalas industriais e posteriormente seria procedida a formulação de um fluido de injeção com as características desejadas de tensão interfacial, viscosidade, presença ou não de ácidos e solventes. No entanto, esse tipo de técnica ainda é inviabilizada pelo alto custo da produção desses compostos em escalas industriais (Mukherjee et al., 2006). Desta forma, mais trabalhos precisam ser realizados tendo como objetivo viabilizar a produção de um fluido de injeção com todas as características desejáveis para a recuperação de óleo, mas, principalmente, economicamente sustentável.

Em nossos trabalhos recentes o isolado de *Bacillus subtilis* RI4914 foi caracterizado como possível produtor de biossurfactante e outros compostos capazes de atuar sinergisticamente como o mesmo na mobilização do petróleo em colunas de areia. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de parâmetros ambientais na recuperação de petróleo em sistemas porosos não consolidados por meio do uso do sobrenadante da cultura do isoldado*B. subtilis* RI4914 como solução surfactante.

2. Material e Métodos

2.1. Isolado bacteriano

A bactéria utilizada nos experimentos foi o isolado *Bacillus subtilis* RI4914, pertencente à coleção de isolados do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), Departamento de Microbiologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais). Essa bactéria foi isolada a partir de água de produção da formação Rio-Itaúnas, Conceição da Barra-ES. O isolado foi mantido em meio TSA e congelado a -80 ºC.

2.2. Produção da solução surfactante

Para o preparo do inóculo, a bactéria foi crescida por 18 horas a 30 ºC e agitação de 200 rpm, em meio MM com a seguinte composição (g L^{-1}): Sacarose (20,0), K_2HPO_4 (13,9), KH_2PO_4 (2,7), NH_4NO_3 (2,0) e 50 mL da solução de elementos traço (EDTA (0,5), $MgSO_4$ (3,0), $MnSO_4$. H_2O (0,5), NaCl (1,0), $CaCl_2$. $_2H_2O$ (0,1), $CoCl_2$. $6H_2O$ (0,1), $ZnSO_4$. $7H_2O$ (0,1), $FeSO_4$. $7H_2O$ (0,1), $CuSO_4$. $5H_2O$ (0,01), Na_2MoO_4 . $2H_2O$ (0,01), $NaSeO_4$ (0,01), $NaWoO_4$. $_2H_2O$ (0,01), $NiCl_2$ (0,02)). Após esse período as células foram lavadas duas vezes em solução de NaCl 0,85% (p/v) e transferidas para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio. As culturas foram crescidas por 24 horas a 30 ºC e agitação de 200 rpm, sendo posteriormente transferidas para uma estufa, onde foram incubadas estaticamente a 30 ºC por 15 dias. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 xg por 15 minutos para a remoção das células, sendo a solução surfactante + polímero composta pelo sobrenadante das culturas livre de células. Para a produção de solução surfactante sem polímero, as culturas foram incubadas na etapa inicial por 48 ao invés de 24 horas.

2.3. Mensuração das tensões interfaciais óleo-água

Para a mensuração das tensões interfaciais entre o petróleo e as soluções surfactantes foi utilizado um tensiômetro *Spinning drop* Krúss, modelo Site 100HS. Após o preenchimento do capilar do aparelho com as soluções surfactantes sob teste, uma gota

de 10 µL de petróleo (fase leve - viscosidade 15 cp) foi introduzida neste por meio da utilização de uma seringa. As leituras foram procedidas em rotação de 4.000 rpm e temperatura de 35 ºC ou aquela determinada pelo tratamento. As tensões interfaciais entre o petróleo e as amostras foram mensuradas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, sendo a tensão interfacial real aquela obtida após alcançar-se a estabilidade dos valores mensurados.

2.3.1. Efeito da concentração do biossurfactante na redução da tensão interfacial óleo-água

Para se avaliar o efeito da concentração do biossurfactante na tensão interfacial foram preparadas soluções aquosas do biossurfactante semi-purificado nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 e 2,0 g L^{-1}. A solução surfactante foi composta por biossurfactante produzido pelo isolado RI4914 recuperado do meio por precipitação ácida e ressuspendido em água deionizada.

2.3.2. Efeito da concentração de NaCl na redução da tensão interfacial óleo-água

O efeito da salinidade da solução surfactante na tensão interfacial foi avaliado por meio da adição de NaCl ao sobrenadante da cultura do isolado RI4914 de modo a obter as concentrações de 3,0, 5,0, 8,0, 10,0 e 12,0% (p/v).

2.3.3. Efeito do pH na redução da tensão interfacial óleo-água

Para se avaliar o efeito do pH da solução surfactante na tensão interfacial o pH do sobrenadante da cultura do isolado RI4914 foi ajustado para os valores de 6, 7, 8 e 9.

2.4. Atividade de Emulsificação

A avaliação da capacidade de emulsificação de querosene foi realizada utilizando-se o biossurfactante semi-purificado e segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Quatro mililitros da solução do biossurfactante a uma concentração de 0,4 g L^{-1} foram misturados a 4 mL do hidrocarboneto em um tubo de vidro de 100 mm X 15 mm. O índice de emulsificação E_{24} foi determinado calculando-se

o volume da camada emulsionada (mm^2), dividindo-se a mesma pelo volume total do líquido e multiplicando-se o valor obtido por 100. A emulsão foi considerada estável se seu volume, 24 horas após a sua formação, correspondeu a 50 % ou mais do seu volume original. Para se avaliar o efeito da salinidade na capacidade emulsificante da solução surfactante, esta foi acrescida de NaCl nas concentração de 2, 4, 6 e 8 % (p/v), seguindo-se avaliação do índice de emulsificação E_{24}. Para se avaliar o efeito do pH da solução surfactante na sua capacidade emulsificante o pH das soluções do biossurfactante foi ajustado para os valores de 6, 7, 8 e 9.

2.5. Experimentos de recuperação de petróleo residual em núcleos porosos não consolidados

Para a realização dos experimentos de recuperação de óleo, foram utilizadas colunas de vidro de 2,5 x 10 cm com volume variável (Kontes Flex Column, Fisher Scientific K420401-2510). Três colunas foram tratadas por vez. As colunas foram empacotadas com 60 g de areia do mar lavada (Fisher Scientific S25-3) e saturadas com água deionizada para a remoção do ar. Em seguida foram injetados 6,5 ml de petróleo cru (viscosidade 15 cp), o que corresponde a 50% do volume poroso total da coluna. As colunas foram submetidas ao tratamento com água deionizada até ser obtida a saturação residual de óleo ou até ser injetado um volume de água correspondente a 10 volumes de poro (VP) da coluna, desta forma simulando a técnica de recuperação secundária de petróleo. Foi calculado o volume de óleo recuperado após o tratamento com a água e, por diferença, o volume de óleo remanescente na coluna. Após este procedimento a coluna foi considerada pronta para o tratamento com as soluções surfactante.

2.5.1. Quantificação do volume de petróleo recuperado e retido na coluna após o tratamento

O petróleo recuperado após o tratamento com água, assim como o petróleo retido na coluna após o tratamento com biossurfactante foi quantificado utilizando a técnica de extração por solvente proposta por Urum et al. (2004). O óleo recuperado pelo tratamento com água foi coletado em funis de decantação, sendo a água obtida no processo drenada pela abertura da válvula. O petróleo retido no funil foi extraído com 40 mL de n-Hexane. Ao final do experimento, a areia da coluna foi removida para um frasco de vidro com

tampa de rosca, sendo seu petróleo residual extraído com 40 mL de n-Hexano. Os extratos obtidos, após serem efetuadas as diluições necessárias, foram submetidos a leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Os volumes de petróleo presentes em cada extrato foram determinados através da confecção de uma curva de calibração com extratos apresentando volumes conhecidos de óleo em n-Hexano.

2.5.2. Efeito da concentração de biossurfactante na recuperação do petróleo

Para o estudo do efeito da concentração de biossurfactante na recuperação de óleo, cinco diferentes concentrações de biossurfactante foram testadas, sendo essas concentrações 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 e 2 g L^{-1} do biossurfactante em questão. Neste experimento, a solução surfactante foi composta por biossurfactante produzido pelo isolado RI4914, como descrito anteriormente, recuperado do meio por precipitação ácida e ressuspendido em água deionizada. As colunas foram preparadas até atingirem a saturação residual de óleo, como descrito anteriormente, e então tratadas com a solução surfactante, em um fluxo contínuo de 0,30 cc/min, para a recuperação do óleo.

2.5.3. Efeito da temperatura na recuperação do petróleo

Para se avaliar o efeito da temperatura na saturação residual de óleo após o tratamento com água e na recuperação do óleo residual, colunas empacotadas com areia foram preparadas como descrito anteriormente e então tratadas com solução surfactante sem polímero nas temperaturas de 30 e 50 ºC. Foi injetado um volume de solução correspondente a 4 volumes de poro (VP) da coluna, seguidos de 1 VP de água, ambos a um fluxo de 0,3 cc min^{-1}. Os resultados foram apresentados como percentual do petróleo remanescente na coluna após os tratamentos com água e solução surfactante.

2.5.4. Efeito da concentração de NaCl na recuperação do petróleo residual

Para se avaliar o efeito da concentração de NaCl na recuperação do óleo residual, o sal foi adicionado à solução surfactante sem polímero de modo a atingir as concentrações de 3,0, 5,0, 8,0 e 10,0 % (p/v). Colunas empacotadas com areia foram preparadas como descrito anteriormente e então tratadas com a solução surfactante com

as diferentes concentrações de NaCl, obedecendo ao volume e fluxo descritos anteriormente. Os resultados foram apresentados como percentual do petróleo remanescente na coluna após os tratamentos com água e solução surfactante.

2.5.5. Efeito do pH na recuperação do petróleo residual

Para se avaliar o efeito do pH na recuperação do óleo residual, HCl ou NaOH foram adicionados à solução surfactante sem polímero de modo a obter-se os valores de pH de 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0. Como descrito anteriormente, colunas empacotadas com areia foram preparadas e tratadas com a solução surfactante nos diferentes pHs, obedecendo ao volume e fluxo descritos anteriormente. Os resultados foram apresentados como percentual do petróleo remanescente na coluna após os tratamentos com água e solução surfactante.

2.5.6. Efeito da presença de polímero na dinâmica de recuperação de petróleo

Para avaliar o efeito da presença do polímero produzido por Bacillus subtilis RI4914 no desempenho e dinâmica de recuperação de petróleo, a solução surfactante polimérica foi produzida como descrito anteriormente e utilizada na recuperação de óleo residual em meio poroso não consolidado. Colunas empacotadas com areia foram preparadas e então tratadas com a solução surfactante contendo polímero e com a mesma solução sem polímero. Para ambas as soluções foi injetado um volume de solução correspondente a 4 volumes de poro (VP) da coluna, seguidos de 1 VP de água, a um fluxo de 0,3 cc min^{-1}.O volume de óleo recuperado após a injeção de cada volume de poro foi mensurado, e os resultados foram expressos em percentual acumulado do petróleo recuperado e percentual do petróleo recuperado a cada volume de poro, ambos em relação ao petróleo residual após tratamento com água.

2.6. Análise Estatística

Os dados experimentais foram apresentados como médias aritméticas de duas ou três repetições, sendo os desvios padrão mostrados pelas barras de erro. Os dados dependentes de efeito quantitativo foram avaliados por regressão. As análises foram feitas por meio da utilização do software Sigmaplot, versão 12.0.0.182 (SPSS Inc., UK).

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito da concentração do biossurfactante na redução da tensão interfacial óleo-água

O efeito da concentração do biossurfactante na tensão interfacial óleo-água pôde ser explicado por uma equação polinomial do 2º grau, onde o aumento da concentração da molécula resultou no decréscimo da tensão (Figura 1). Foi observada uma redução da tensão interfacial de 43 mN/m para valores inferiores a 1,3 mN/m. Dentre as concentrações de biossurfactante testadas, pôde-se observar a redução da tensão interfacial de 3,8 mN/m na presença de 0,2 g L^{-1} da molécula para 1,2 mN/m, quando essa concentração foi elevada para 2g L^{-1}. A adição de biossurfactante em uma concentração acima de 1,2 g L^{-1} não resultou em uma maior redução da tensão, o que pode significar, em teoria, que o valor de tensão interfacial obtido nesta condição estaria próximo do valor mínimo capaz de ser alcançado por essa molécula surfactante. Dever ser ressaltado, no entanto, que a condição aqui testada não inclui a utilização de nenhum co-surfactante ou sal capaz de promover um aumento de atividade do biossurfactante.

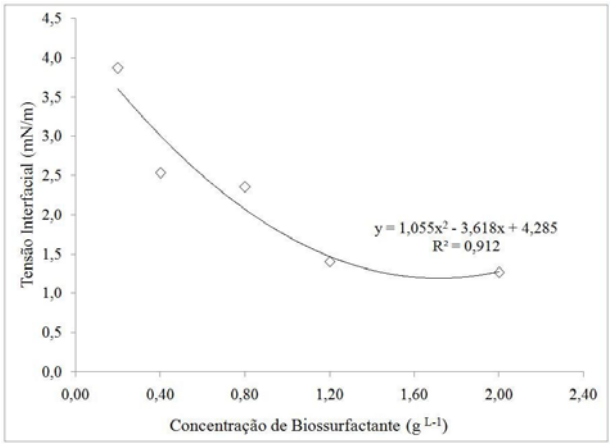

Figura 1. Efeito da concentração do biossurfactante na redução da tensão interfacial óleo-água. A molécula foi concentrada por precipitação ácida e solubilizada de modo a apresentar as concentrações desejadas. As mensurações se deram a 35 ºC entre as soluções e 10 µL de petróleo.

3.2. Efeito da concentração de NaCl na tensão interfacial óleo-água

A adição de NaCl ao sobrenadante da cultura do isolado RI4914 promoveu uma redução exponencial da tensão interfacial óleo-água (Figura 2). A tensão foi reduzida de aproximadamente 1,9 mN/m, na ausência de NaCl, para 0,244 mN/m quando o sal foi adicionado em uma concentração de 12% (p/v).

Segundo Sharma e Shah (1989), a tensão interfacial é um parâmetro altamente dependente da salinidade da fase aquosa. Alterando-se a salinidade da fase aquosa pode-se alterar significativamente a solubilidade relativa do surfactante, o que levará a uma alteração do coeficiente de partição da molécula entre as duas fases. O aumento da concentração salina da fase aquosa promove a migração das moléculas surfactantes para a fase oleosa e, conseqüentemente, a redução da concentração do surfactante na fase aquosa. De maneira oposta, a redução da concentração salina na fase aquosa leva a um acúmulo de grande parte do surfactante nessa fase e, consequentemente, a redução da concentração dessas moléculas na fase oleosa. De acordo com os autores, a concentração ótima de sal é aquela capaz de promover o equilíbrio da distribuição do surfactante entre as fases aquosa e oleosa, o que leva a um acúmulo da molécula na interface das fases, culminando na geração de uma tensão interfacial ultra-baixa. Porém, o aumento da concentração salina para valores acima da concentração ótima levam novamente ao aumento da tensão interfacial.

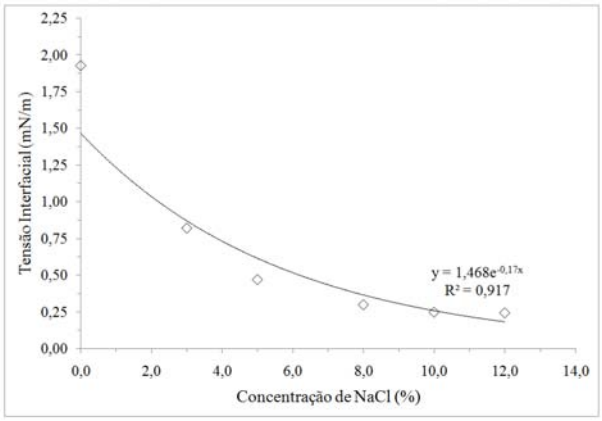

Figura 2. Efeito da concentração de NaCl no sobrenadante da cultura do isolado *B. subtilis* RI4914 na redução da tensão interfacial óleo-água. As mensurações se deram a 35 ºC entre a solução surfactante e 10 µL de petróleo.

3.3. Efeito do pH na tensão interfacial óleo-água

O efeito do pH na tensão interfacial foi bastante pronunciado principalmente em baixos valores. Assim como relatado anteriormente, em pHs baixos as moléculas do biossurfactante tendem a sair de solução, o que provocou, neste caso, uma elevação brusca da tensão interfacial óleo-água (Figura 3). Nos demais tratamentos testados, porém, não pôde ser observada nenhuma tendência significativa relativa ao aumento ou redução da atividade do biossurfactante em relação ao aumento do pH, sendo notada uma certa estabilidade nos valores de tensão. Pôde ser notado apenas um pequeno aumento de tensão interfacial quando comparados os tratamentos com pHs 8,0 e 9,0 com o tratamento com pH 7,0. Análises preliminares indicam que o biossurfactante em questão é uma surfactina (dados não mostrados), logo, essa variação pode ser explicada pela desprotonação dos radicais glutamil e asparagil em pH neutro, o que leva à geração de duas cargas negativas na molécula. A presença dessas cargas torna a molécula de surfactina menos hidrofobia e, além disso, causa uma alteração conformacional na molécula capaz de alterar suas propriedades de superfície (Shen et al., 2011).

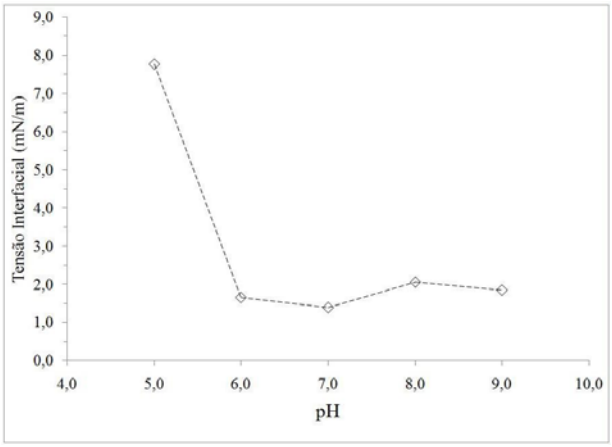

Figura 3. Efeito do pH do sobrenadante da cultura do isolado *B. subtilis* RI4914 na redução da tensão interfacial óleo-água. As mensurações se deram a 35 ºC entre a solução surfactante e 10 µL de petróleo.

3.4. Atividade de Emulsificação

3.4.1. Efeito da concentração de NaCl

O efeito da concentração de NaCl na capacidade emulsificante do biossurfactante pôde ser explicado por uma equação polinomial do 2º grau, onde o volume de emulsão estável formada reduz com o aumento da concentração do sal (Figura 4). Ressalta-se ainda que as emulsões formadas nas concentrações de 6 e 8% de NaCl não foram estáveis, uma vez que não satisfizeram o pré-requisito de manter 50% ou mais de estabilidade após 24 horas.

Como já relatado anteriormente, alterando-se a salinidade da fase aquosa pode-se alterar o coeficiente de partição da molécula entre as duas fases, de forma que o aumento da concentração de NaCl fez com que o biossurfactante migrasse para o querosene utilizado como fonte hidrofóbica nesse experimento. Ao migrar para o querosene, obrigatoriamente as micelas dos surfactantes, se existentes, estarão presentes de maneira inversa à encontrada em solução aquosa, ou seja, com a parte polar voltada para o centro da micela e a parte apolar voltada para o solvente. Neste caso, a formação de emulsão também ocorre de maneira inversa, sendo obtida uma emulsão água em óleo ao invés de uma emulsão óleo em água como ocorre normalmente. Na emulsão água em óleo, gotículas de água se encontram emulsificadas em um filme contínuo de óleo.

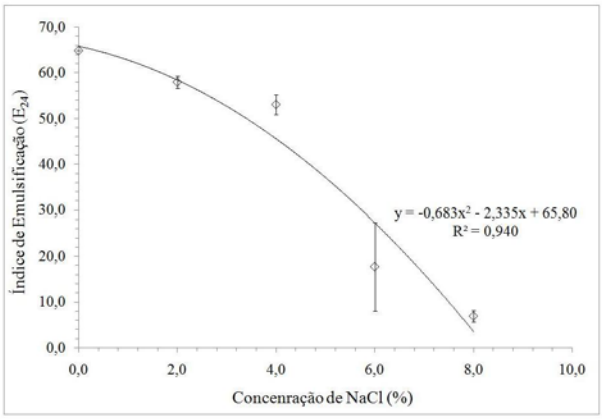

Figura 4. Efeito da concentração de NaCl no índice de emulsificação E_{24} do biossurfactante em querosene. A concentração de biossurfactante utilizada foi de 0,4 g L^{-1}.

O biossurfactante parece não possuir a habilidade de formar micelas invertidas, uma vez que não foi capaz de formar emulsão estável com querosene em concentrações de NaCl superiores a 4%. Três fatores dão suporte a essa hipótese: (1) os dados de tensão

interfacial versus concentração de NaCl apresentados anteriormente (Figura 2) comprovam que o biossurfactante apresenta alta atividade em concentrações de sal superiores a 4%, o que descarta a hipótese de desestabilização da molécula; (2) a surfactina apresenta um grupo polar formado por 7 resíduos de aminoácidos, grupo este que pode ser grande demais para ser acomodado em grande número no centro de uma micela; e (3) a molécula de surfactina não foi evolutivamente selecionada para a formação de micelas invertidas em solventes apolares, uma vez que as bactérias produtoras tem que viver obrigatoriamente em fase aquosa. Contudo, mais experimentos devem ser conduzidos no intuito de comprovar essa hipótese.

3.4.2. Efeito do pH

O biossurfactante foi capaz de formar emulsão estável em todos os pHs testados, porém, foi avaliada uma redução no volume de emulsão formada em pH 5,0 (Figura 5). O início do processo de precipitação das moléculas de surfactina em pHs abaixo de 5,0 pode explicar tal evento, uma vez que a solubilidade dessas moléculas é primordial para sua atividade. Nas demais condições testadas não foi observada nenhuma influência do pH na capacidade emulsificante do biossurfactante, sendo mensurados volumes emulsões estáveis em torno de 65,0%. Esse fato indica boa estabilidade do composto mediante condições ambientais adversas.

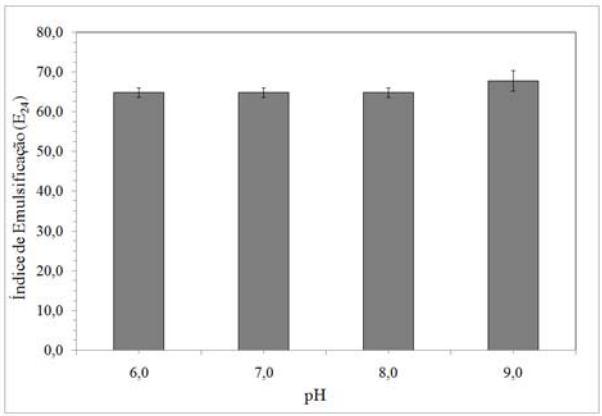

Figura 5. Efeito do pH no índice de emulsificação E_{24} do biossurfactante em querosene. A concentração de biossurfactante utilizada foi de 0,4 g L^{-1}.

3.5. Experimentos de recuperação de petróleo residual em núcleos porosos não consolidados

3.5.1. Efeito da concentração de biossurfactante na recuperação do petróleo

Neste experimento, cinco diferentes concentrações do biossurfactante produzido pelo isolado RI4914 foram utilizadas para a recuperação de óleo residual em colunas empacotadas com areia. A figura 6 mostra a relação entre a concentração de biossurfactante utilizada e a porcentagem de óleo residual recuperada. Pode ser observado que a quantidade de óleo recuperado aumenta linearmente com o aumento da concentração de biossurfactante, o que demonstra a capacidade da molécula em promover a mobilização do petróleo. Os valores de recuperação do óleo residual obtidos nesse experimento chegaram a 40%, quando uma solução de biossurfactante com concentração de 2 g L^{-1} foi utilizada.

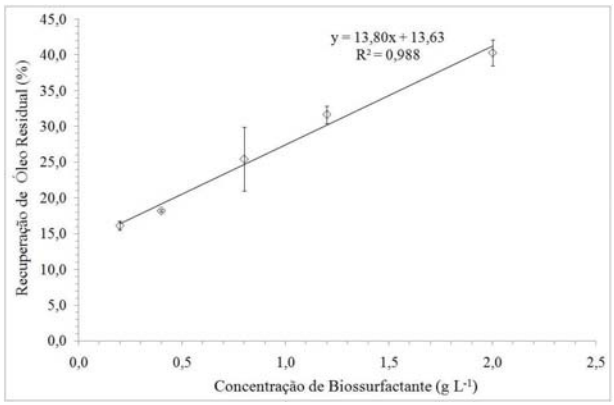

Figura 6. Efeito da concentração de biossurfactante na recuperação de óleo residual em sistemas porosos não consolidados. A molécula foi concentrada por precipitação ácida e solubilizada de modo a apresentar as concentrações desejadas. Foram injetados 4 volumes de poro (VP) da solução surfactante + 1 VP de água.

Apesar de não ter sido observada uma redução da tensão interfacial quando a concentração de biossurfactante na solução foi elevada de 1,2 para 2,0 g L^{-1} (Figura 1), foi observado um aumento significativo na quantidade de óleo residual recuperado, o que indica que, possivelmente, a redução da tensão interfacial óleo-solução surfactante não foi

o fenômeno que governou a mobilização do óleo neste experimento. Outros dois fatores reforçam essa hipótese: (1) as tensões interfaciais mensuradas entre as soluções de biossurfactante e o óleo são consideradas altas para promover uma eficiente redução das forças capilares. Segundo Sharma e Shah (1989), a tensão interfacial deve ser reduzida para valores entre 10^{-1} e 10^{-2} mN/m para promover a mobilização do óleo residual de um reservatório; (2) o óleo residual recuperado das colunas sempre se apresentou na forma de pequenas gotículas emulsificadas, ao invés de um filme contínuo de óleo como é observado em sistemas com baixa tensão interfacial. Esses fatos levam a crer que a recuperação de óleo observada neste experimento foi proporcionada principalmente pela capacidade emulsificante apresentada pelo biossurfactante produzido pelo isolado RI4914 (Figura 4). Ressalta-se ainda que as concentrações de biossurfactante capazes de promover uma expressiva recuperação do óleo residual são consideradas extremamente altas, o que tornaria sua utilização em larga escala financeiramente inviável visto o alto custo atual de produção da molécula e o baixo rendimento das culturas (Mukherjee et al., 2006). Esses dados mostram que o biossurfactante por si só não é capaz de promover uma recuperação expressiva do petróleo residual em concentrações economicamente viáveis, sendo necessária a adição de compostos capazes de atuar como co-surfactantes, melhorando a performance do biossurfactante, ou atuar de maneira sinérgica a este na recuperação do óleo.

3.5.2. Efeito da temperatura na recuperação do petróleo

A figura 7 ilustra o efeito da temperatura na saturação residual de óleo dos sistemas porosos após o tratamento com água e após o tratamento com água mais solução surfactante. Pode-se observar que, a 30 ºC, a saturação residual de óleo nas colunas gira em torno de 80% do petróleo injetado após o tratamento com água, podendo variar, no entanto, de 70 a 95% de retenção do óleo. Essa variação pode estar associada com uma mínima variação térmica do óleo durante o processo de injeção, o que parece acarretar em variações significativas em sua viscosidade. A elevação da temperatura de 30 para 50 ºC reduziu para pouco mais 50% a saturação residual de óleo da coluna, fato este associado à concomitante redução da viscosidade do petróleo, o que permite que um maior percentual do composto seja recuperado com a injeção de água.

A injeção da solução surfactante foi capaz de reduzir a saturação residual de óleo em ambas as temperaturas testadas. Quando injetada a 30 ºC, a solução surfactante foi

capaz de reduzir o residual de óleo de 80 para aproximadamente 27% do total injetado, apresentando um aumento de quase 55% na recuperação de petróleo. Quando a temperatura do sistema foi elevada para 50 ºC, a injeção da solução surfactante também foi capaz de promover a recuperação do óleo residual da coluna, uma vez que a saturação foi reduzida de 50% para aproximadamente 30% do petróleo total injetado, o que representa um ganho de 20% na produção.

No tratamento controle, onde o biossurfactante do sobrenadante da cultura do isolado *B. subtilis* RI4914 foi removido através de ultra-filtração, a solução injetada conseguiu reduzir somente 6% da saturação residual de óleo da coluna, que caiu de caiu de 93 para 87% do petróleo total injetado. Esse dado mostra que o biossurfactante é o responsável principal pela mobilização do petróleo residual da coluna, mas que a bactéria também é capaz de produzir outros compostos que atuam de maneira paralela às moléculas surfactantes. Um desses compostos foi identificado por meio de análise em HPLC como sendo o etanol, capaz de agir como solvente e auxiliar na mobilização do óleo residual (Dados não mostrados).

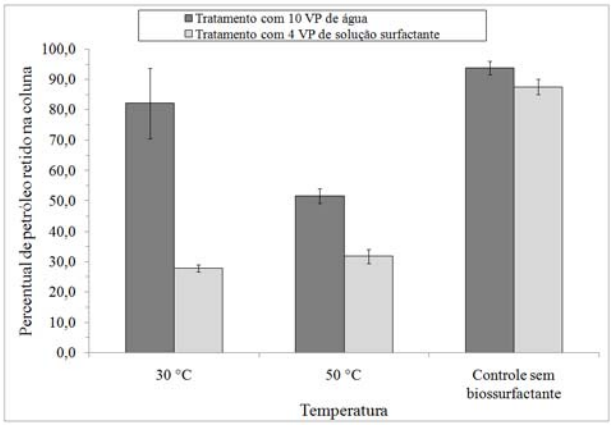

Figura 7. Efeito da temperatura na redução da saturação residual de óleo em sistemas porosos não consolidados. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da solução surfactante (sobrenadante da cultura RI4914 + 10% NaCl) + 1 VP de água. No tratamento controle sem biossurfactante o mesmo foi removido do sobrenadante por ultrafiltração e o tratamento conduzido a 30 ºC.

3.5.3. Efeito da concentração de NaCl na recuperação do petróleo residual

O efeito da concentração de NaCl na saturação residual de petróleo nos sistemas porosos pode ser explicado por uma equação polinomial do terceiro grau. Na ausência do sal o residual de óleo na coluna após o tratamento com água e solução surfactante foi de aproximadamente 43,0% do petróleo total injetado. A elevação da concentração salina para 3,0% (p/v) resultou na redução dessa saturação residual para 34,0%, permanecendo relativamente estável quando a concentração de NaCl foi ajustada para 5,0 e posteriormente 8,0%. Quando a concentração de sal foi de 10,0%, observou-se uma nova redução do residual de óleo presente na coluna, caindo de 34,0 para 27,0% (Figura 8).

A recuperação de óleo em sistemas porosos está intimamente associada à redução da tensão interfacial óleo-água e consequentemente com a redução das forças capilares que previnem a movimentação do composto pelos poros da matriz. No entanto, nesse experimento, outros fenômenos parecem estar atuando de maneira distinta para a mobilização do petróleo. As tensões interfaciais de 1,9, 0,82 e 0,47 mN/m mensuradas entre a solução surfactante e o petróleo, nas respectivas concentrações de 0,0, 3,0 e 5,0% de NaCl (Figura 2), não são consideradas suficientemente baixas para promover a redução das forças capilares, sendo a mobilização do óleo, neste caso, atribuída a capacidade emulsificante do biossurfactante. Por outro lado, as tensões interfaciais de 0,3 e 0,24 mN/m mensuradas, respectivamente, para os tratamentos com 8,0 e 10,0% de NaCl, parecem reduzir significativamente as forças capilares e proporcionarem a mobilização do óleo. Tal afirmação pode ser feita uma vez que o biossurfactante não é capaz de formar emulsão estável em concentrações de NaCl superiores a 6% (p/v) (Figura 4).

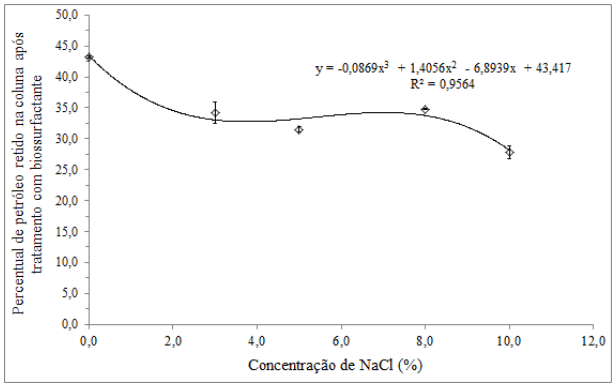

Figura 8. Efeito da concentração de NaCl do sobrenadante da cultura RI4914 na redução da saturação residual de óleo em sistemas porosos não consolidados. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da solução surfactante + 1 VP de água.

3.5.4. Efeito do pH na recuperação do petróleo residual

A figura 9 ilustra o efeito do pH da solução surfactante na sua capacidade de redução da saturação residual de petróleo em sistemas porosos não consolidados. Pode ser observado que o percentual de petróleo residual após o tratamento com a água e a solução surfactante foi menor quando o pH da solução foi ajustado para 7,0, estando na ordem de 27% do óleo total injetado. Tanto o abaixamento quanto a elevação do pH causaram uma elevação da saturação de óleo, demonstrando que o pH ótimo para a atuação da solução surfactante é 7,0.

No entanto, os dados de tensão interfacial e índice de emulsificação (Figuras 3 e 5, respectivamente) demonstram que o biossurfactante é estável e não apresenta redução significativa de atividade na faixa de pH testada, o que indica que outros fenômenos podem estar associados à perda de sua eficiência no processo de mobilização do petróleo residual. Fenômenos como perda por adsorção e partição do biossurfactante na fase oleosa são de extrema importância na dinâmica de recuperação de petróleo, sendo assim alvo prioritário para futuros experimentos.

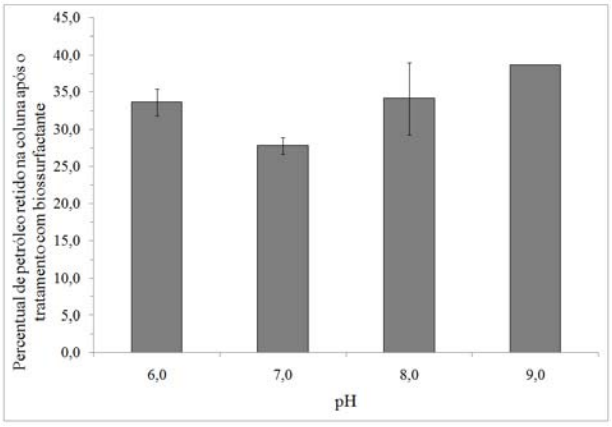

Figura 9. Efeito do pH do sobrenadante da cultura RI4914 na redução da saturação residual de óleo em sistemas porosos não consolidados. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da solução surfactante + 1 VP de água.

3.5.5. Efeito da presença de polímero na dinâmica de recuperação de petróleo

O isolado *B. subtilis* RI4914 foi caracterizado como produtor de um polímero com possíveis aplicações no processo de recuperação do petróleo residual. O efeito da presença desse polímero, com o aumento da viscosidade do sobrenadante da cultura injetado, foi avaliado de modo a se caracterizar um possível ganho de desempenho dessa solução surfactante na redução da saturação residual de óleo.

A figura 10 mostra o efeito da presença do polímero na recuperação percentual do óleo residual da coluna. Pode observar que a solução surfactante contendo polímero foi capaz de recuperar em torno de 88% do petróleo residual presente na coluna, enquanto a mesma solução sem polímero só pôde recuperar aproximadamente 70% do mesmo (Figura 10A). É importante ressaltar que dos 88% do óleo residual recuperado no tratamento com polímero, 63% foram recuperados nos dois primeiros volumes de poro injetados, o que é de extrema importância operacional, já que esse método proporciona a recuperação de um maior volume de petróleo com um menor esforço e com a produção de um menor volume de água. A figura 10B mostra o deslocamento do pico de recuperação de óleo, no tratamento com polímero, em direção aos dois primeiro volumes de poro, uma vez que em cada um foi recuperado quase 32% de todo o petróleo mobilizado. No tratamento sem polímero, é notória a baixa recuperação de óleo no primeiro volume de

poro, sendo o pico de recuperação observado no segundo volume de poro injetado. No entanto, o pico observado compreende a recuperação de somente 25% do óleo residual. Em ambos os tratamentos é observada uma queda na produção de petróleo após o segundo volume de poro injetado, porém essa queda é mais pronunciada no tratamento com polímero, o que indica a existência de um esgotamento antecipado do óleo residual recuperável nessas condições.

A recuperação de petróleo em sistemas porosos é drasticamente influenciada pela variável Razão de Mobilidade (***M***), dada pela fórmula:

$$M = (k_w . \mu_o) / (k_o . \mu_w)$$

Onde k_w representa a permeabilidade relativa da água na região preenchida com água, k_oé a permeabilidade relativa do óleo na região saturada de óleo, μ_o é a viscosidade do óleo e μ_w é a viscosidade da água. A presença de polímeros capazes de aumentar a viscosidade da fase aquosa se torna extremamente importante uma vez que situações que proporcionem valores de ***M*** menores que um, favorecerão o processo de recuperação do óleo (13). O controle da mobilidade da fase aquosa por meio da adição de substâncias poliméricas ao fluido de injeção impede a formação de canais preferenciais através do petróleo, aumentando consideravelmente sua mobilização e consequentemente a eficiência do processo de recuperação.

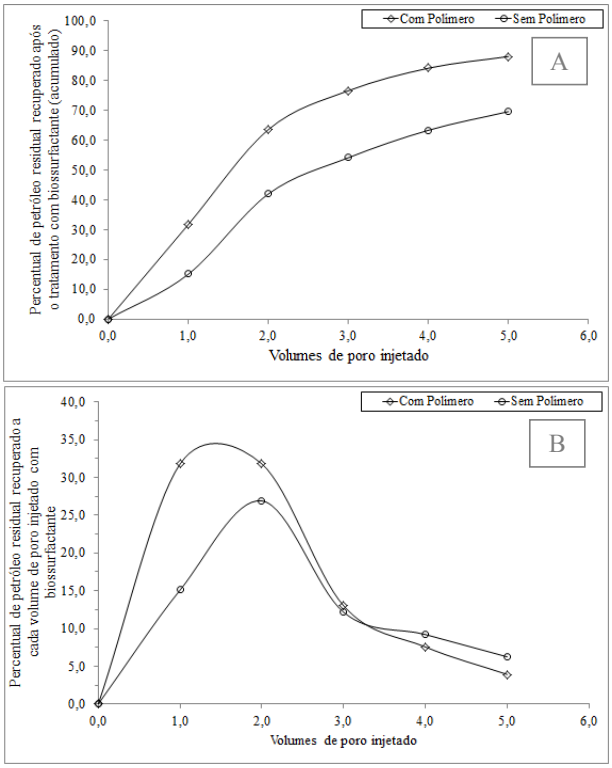

Figura 10. Efeito da presença de polímero no sobrenadante da cultura RI4914 na dinâmica de recuperação de óleo residual em sistemas porosos não consolidados. (A) Percentual de petróleo residual recuperado (acumulado); (B) Percentual de petróleo residual recuperado em cada volume de poro injetado. Foram injetados 4 volumes de poro (VP) da solução surfactante + 1 VP de água.

4. Conclusões

Neste trabalho, foi avaliado o efeito de condições ambientais na recuperação de petróleo pelo biossurfactante produzido por *B. subtilis* RI4914. Foi demonstrado que o biossurfactante é capaz de promover a recuperação do óleo residual em sistemas porosos não consolidados sob as mais diversas condições de salinidade e pH. Foi observado que a solução de biossurfactante semi-purificada é capaz de mobilizar até 40% do óleo residual das colunas, porém somente em concentrações elevadas (2 g L^{-1}). Por outro lado, a utilização do sobrenadante da cultura do Isolado RI4914 proporcionou recuperação de óleo superior à alcançada com a solução do biossurfactante e em uma concentração até dez

vezes menor da molécula. Tais resultados indicam a produção de compostos capazes de atuar sinergisticamente com o biossurfactante na redução da tensão interfacial, alcançando valores de até 0,07 mN/m. O biossurfactante demonstrou ser mais efetivo na recuperação do óleo em altas concentrações salinas, o que é considerado a condição ideal, uma vez que os reservatórios normalmente apresentam esse tipo de condição. A solução surfactante contendo polímero foi capaz de recuperar em torno de 88% do petróleo residual presente na coluna, enquanto a mesma solução sem polímero só pôde recuperar aproximadamente 70% do mesmo. É importante ressaltar que dos 88% do óleo residual recuperado no tratamento com polímero, 63% foram recuperados nos dois primeiros volumes de poro injetados, o que é de extrema importância operacional, já que esse método proporciona a recuperação de um maior volume de petróleo com um menor esforço e com a produção de um menor volume de água.

Esses resultados mostram que a MEOR baseada na utilização de biossurfactantes possui um grande potencial para a recuperação do petróleo residual contido nos reservatórios e que os problemas envolvendo o baixo rendimento na produção desses compostos podem ser contornados através do isolamento de micro-organismos capazes de produzir compostos que ajam em cooperação para a recuperação do óleo, e, mais importante, em concentrações consideradas suficientes para tal.

5. Referências Bibliográficas

Adkins, J. P., R. S.Tanner, E. O. Udegbunam, M. J. McInerney e R. M.Knapp. 1992. Microbially enhanced oil recovery from unconsolidated limestone cores.Geomicrobiol.**10**: 77–86.

Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation - a review.Bioresour. Technol.**51**: 1–12.

Banat, I.M., R.S. Makkare, S.S.Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants.Appl. Microbiol.Biotechnol.**53**: 495–508.

Belyaev S.S., I.A. Borzenkov, T.N. Nazina,E.P. Rozanova,I.F. Glumove R.R.Ibatullin. 2004. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oilrecovery Microbiol (MaikNaukaInterperiodica). **73**: 590–598.

Brown, L., A.A. Vadiee Stephens, J.O. 2002. Slowing production declineand extending the economic life of an oil field: New MEORtechnology.SPE Reserv.Eval. Eng.**5**:33–41.

Brown, L.R. 2010.Microbial enhanced oil recovery (MEOR). Current Opinion in Microbiology.**13**:316–320. P

Cooper, D.J. e B.G.Goldenberg.1987. Surface active agents from two Bacillus species.Applied Environmental Microbiology.**54**: 224-229.

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

Holzwarth, G. 1985. Xanthan and scleroglucan: structure and use in enhanced oil recovery. Dev. Ind. Microbiol.**26**: 271–280.

Li, Q., C. Kang, H. Wang, C. Liu,e C.Zhang. 2000. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing OilfieldBiochem. Eng. J.**11**: 197–199.

Lundquist, A. D., D. Cheney, C. L. Powell, P. O'Neill, G. Norton, A. M.Veneman, N. Y. Evans, S. Mineta, S. Abraham, J. M. Allbaugh, C. T.Whitman, J. B. Bolten, M. E. Daniels, L. B. Lindsey e R. Barrales. 2001. Energy for a new century: increasingdomesticenergyproduction. NationalenergypolicyreportoftheNational Energy PolicyDevelopmentGroup.U.S. GovernmentPrinting Office, Washington, DC.

Maneerat, S. 2005. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources.Songklanakarin J. Sci. Technol.**27**: 675–683.

Maudgalya, S., R. M. Knapp, M. J.McInerney.2007. Microbial enhancedoilrecovery technologies: a review of the past, present, and future. SPE Production and Operations Symposium; Oklahoma City, OK.

McInerney, M. J., D.P.Nagle, e R. Knapp, M. Folmsbee. 2005. Microbiallyenhancedoilrecovery: past, present, and future, p. 215–237. *In* B. Ollivierand M.Magot (ed.), Petroleummicrobiology. ASM Press, Washington DC.

Mukherjee, S., P. Das e R. Sem. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants.TrendsBiotechnol.**24**: 509–515.

Nitschke, M. e G. Pastore. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Biores. Technol.**97**: 336–341.

Nitschke, M., S.G.V.A. Costa, R. Haddad, L.A.G. Gonçalves, M.N.E BerlineJ. Contiero.2005. Oil wastes as unconventionalsubstrates for rhamnolipidbiosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*LBI. Biotechnol.Prog.**21**: 1562–1566.

Okpokwasili, G.C. e A.A. Ibiene. 2006. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug.African Journal of Biotechnology.**5**: 453–456.

Sharma, M. K., D.O. Shah. 1989. Use of surfactants in oil recovery, p. 253–315.*In*E. C. Donaldson e G. V. Chilingarian, Enhanced oil recovery II process and operations. The Fu Yen (ed), Elsevier, New York.

Shen, H.H., T.W. Lin, R.K. Thomas, D.J.F. Taylor, e J.Penfold. 2011. Surfactin Structures at Interfaces and in Solution: The Effect of pH and Cations. Journal of Physical Chemistry.**115**: 4427-4435.

Udegbunam, E. O., J. P.Adkins, R. M.Knapp, e M. J.McInerney. 1991. Assessing the Effects of Microbial Metabolismand Metabolites on Reservoir Pore Structure.SPE 22846.Proceedings of SPE annual Technical Conference and Exhibition.Society of Petroleum Engineers, Richardson, TX.

Updegraff, D.1983. Plugging and penetration of petroleumreservoir by microorganisms.*In*Proceedings of the International Conference on Microbial Enhancement of Oil Recovery, .80–85.

Urum, K., T. Pekdemir,M. Çopur. 2004.Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. Journal of Colloid and Interface Science. 456–46.

Van Hamme J. D., A. Singh e O.P.Ward. 2003. Recent advances in petroleummicrobiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev.**67**: 503–549.