

PATRÍCIA BERNARDES NOBRE

**EFEITO DE SALINIDADE, pH, CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E
HIDROFOBICIDADE CELULAR SOBRE A RECUPERAÇÃO DE
PETRÓLEO EM SISTEMA POROSO POR *Acinetobacter sp.***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

PATRÍCIA BERNARDES NOBRE

**EFEITO DE SALINIDADE, pH, CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E
HIDROFOBICIDADE CELULAR SOBRE A RECUPERAÇÃO DE
PETRÓLEO EM SISTEMA POROSO POR *Acinetobacter* sp.**

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2012

Maurício Dutra Costa

Antônio Galvão do Nascimento

Aline Dias Paiva

Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e pela chuva de bênçãos.

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 professores Marcos Rogério Tótola e Arnaldo Chaer Borges, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança.

A cada integrante do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, cúmplices fundamentais na execução deste trabalho.

Aos meus amorosos pais, Constantino e Eulene, por toda a sabedoria, pelo amor, pelos princípios e valores.

Ao meu irmão Vinícius, pelo companheirismo.

Ao meu marido, Péricles L. Fernandes, pela orientação, por cuidar do meu coração como um precioso tesouro e por ser o meu porto em todos os momentos.

Aos colegas que se fizeram amigos, pelo apoio, pelos risos e por toda a confiança.

Aos meus “anjos”, minhas amigas, por partilharem difíceis e belos momentos.

Aos meus tios, primos e avós, por orarem e me apoiarem.

A todos, minha eterna gratidão.

BIOGRAFIA

PATRÍCIA BERNARDES NOBRE, filha de Constantino Neto Nobre e Eulene Francisco Bernardes Nobre, nasceu em Corinto, Minas Gerais, no dia 04 de setembro de 1985.

Em janeiro de 2009, diplomou-se em Biologia, Bacharelado, pela Universidade Estadual de Montes Claros.

Em agosto de 2009 iniciou o programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, na área de Microbiologia Ambiental.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Recuperação melhorada de petróleo	3
2.2. Recuperação de petróleo melhorada por micro-organismos	3
2.3. Hidrofobicidade da superfície celular microbiana.....	4
2.4. O gênero <i>Acinetobacter</i>	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Isolado bacteriano	10
3.2.1. Avaliação da hidrofobicidade celular.....	10
3.2.2. Avaliação da atividade de emulsificação de óleo das células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 e estabilidade da emulsão	11
3.3. Efeito da idade da cultura na hidrofobicidade das células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 durante o crescimento em meio de cultura TSB adicionado de glicose	11
3.4. Influência da concentração de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado	12
3.4.1. Preparação dos sistemas porosos não-consolidados	12
3.4.2. Quantificação do volume de petróleo retido no sistema poroso não-consolidado após a injeção de suspensões de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1	13
3.4.3. Recuperação de petróleo residual de sistema poroso não-consolidado pela injeção de células hidrofóbicas de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1.....	13
3.4.4. Recuperação de petróleo residual de sistema poroso não-consolidado pela injeção de células hidrofílicas de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1.....	14
3.4.5. Efeito da integridade de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado	14
3.4.6. Efeito do pH e da salinidade da suspensão de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado	14

3.5. Análises estatísticas	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Avaliação da hidrofobicidade de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 em caldo TSB suplementado com glicose	16
4.3. Efeito da idade da cultura na hidrofobicidade das células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 durante o crescimento em meio de cultura TSB adicionado de glicose	18
4.4. Experimentos de recuperação de petróleo residual	20
4.4.1. Influência da concentração de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado.....	20
4.4.2. Recuperação de petróleo residual de sistema poroso não-consolidado pela injeção de células hidrofílicas de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1.....	23
4.4.3. Efeito da integridade de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado	24
4.4.4. Efeito do pH da suspensão de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado.....	25
4.4.5. Efeito da salinidade da suspensão de células de <i>Acinetobacter</i> sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado	27
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

NOBRE, Patrícia Bernardes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Efeito de salinidade, pH, concentração de células e hidrofobicidade celular sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso por *Acinetobacter sp.*** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientador: Arnaldo Chaer Borges

A base energética de um país é um dos principais fatores que determinam o seu potencial de crescimento econômico. Considerando-se o cenário de aumento da demanda de energia no mundo e a depleção dos reservatórios de petróleo, o desenvolvimento de novas tecnologias de exploração, que propiciem aumento da capacidade de recuperação de óleo, é estratégico para a garantia do suprimento de energia. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade das células de *Acinetobacter sp.* LBBMA LU1 em promover a recuperação de óleo residual em sistema poroso não-consolidado. A injeção da suspensão de células de *Acinetobacter sp.* reduziu a saturação de óleo residual, em todas as concentrações testadas. Após a injeção da suspensão de células (4 volumes porosos, D.O.₆₀₀ = 10,0), apenas 26,0 % do óleo retido na coluna nela permaneceram. Esse valor foi reduzido para 22 % quando se utilizou suspensão com maior concentração de células (D.O.₆₀₀ = 20,0). O total de óleo recuperado pela injeção de solução salina (recuperação secundária) e de suspensão de células (recuperação terciária) foi superior a 80% do volume de óleo originalmente contido nas colunas. A alta hidrofobicidade das células concorreu para a recuperação do petróleo residual, juntamente com fatores que influenciam a estabilidade da atividade celular, como a temperatura, o pH e a salinidade. O tratamento de esterilização da suspensão de células de *Acinetobacter sp.* LBBMA LU1 por autoclavagem, antes da injeção, demonstrou que a integridade das células é de importância para o processo de recuperação do petróleo residual. O efeito da variação do pH sobre a retenção de óleo em colunas mostrou-se pronunciado; no tratamento com pH 8,5, a recuperação foi 34 % maior do que a obtida no tratamento-controle (pH 7,4). Em pH 9,5, a recuperação foi 18 % superior à do controle. A salinidade do líquido de injeção das células (50 ou 100 g L⁻¹) exerce expressiva influência sobre a saturação residual de petróleo, como demonstrado pela retenção do equivalente a cerca de 30 % a mais de petróleo do que no controle (sem adição de sal). Em resumo, conclui-se que a expressiva recuperação de óleo residual em sistema poroso não consolidado, resultante da injeção de células de *Acinetobacter*

sp. LBBMA LU1 em suspensão, com acidez e salinidade definidas, demonstra o potencial da bactéria para inclusão em estudos a respeito de estratégias de recuperação avançada de petróleo.

ABSTRACT

NOBRE, Patrícia Bernardes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2012. **Effect of salinity, pH, cell concentration and cell hydrophobicity on oil recovery in pore systems by *Acinetobacter* sp.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisor: Arnaldo Chaer Borges

Energy supply is one of the main factors that determine a nation's potential for economic growth. Taking in account the scenario of increased energy demand worldwide and the depletion of oil reservoirs, the development of new exploration technologies, which provide increased capacity for oil recovery, is strategic for the supply of energy. This study evaluated the ability of cells of *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 to promote the recovery of residual oil from unconsolidated porous system. The injection of cell suspensions of *Acinetobacter* sp. reduced residual oil saturation, at all concentrations tested. After injection of the cell suspension (4 pore volumes, $OD_{600} = 10.0$), 74% of residual oil were recovered. This value was increased to 78% when using suspension with a higher concentration of cells ($OD_{600} = 20.0$). The amount of oil recovered by saline injection (secondary recovery) and the cell suspension (tertiary recovery) was greater than 80% of the oil originally contained in the columns. The high hydrophobicity of cells contributed to the recovery of residual oil, together with factors that influence cellular activity and stability, such as temperature, pH and salinity. The sterilization treatment of the cell suspension of *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 by autoclaving prior to injection showed that the integrity of cells is important for the recovery of residual oil. The effect of pH on the retention of oil in columns proved to be considerable: at pH 8.5, recovery was 34% higher than that obtained in the control treatment (pH 7.4). At pH 9.5, the recovery was 18% higher than in control. The salinity of the cell suspension (50 or 100 g L⁻¹) exerts a significant influence on the residual oil saturation, as evidenced by retention of about 30% more oil than in the control (no salt addition). In summary, the significant recovery of residual oil from unconsolidated porous systems by injection of cells of *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, under defined acidity and salinity, demonstrates the potential of this bacteria in microbially enhanced oil recovery.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de petróleo é responsável pela produção de insumos de difícil substituição na matriz produtiva de qualquer país, sendo esses insumos a base do modo de produção e de consumo e mesmo da cultura da sociedade moderna. A disponibilidade de petróleo e de seus derivados, bem como seu preço, têm grande importância para a determinação do nível de crescimento econômico e do nível de preços das economias nacionais, pois energia e transporte são insumos necessários para produção de quaisquer bens ou serviços. O petróleo está assim na formação e sustentação dos alicerces da economia industrial moderna.

Nas últimas décadas ocorreu uma rápida expansão da economia mundial, e este forte crescimento se traduziu em aumentos significativos na demanda de óleo, particularmente por parte dos países de mercado emergente. As previsões da Energy Information Administration (EIA, 2011) relatam um aumento do consumo de energia comercializada no mundo advinda de todas as fontes combustíveis, com estimativa de crescimento de 53% do consumo de energia de 2008 a 2035 (EIA, 2011).

O Brasil é o nono maior consumidor de energia no mundo e o terceiro maior da América, atrás dos Estados Unidos e do Canadá. O consumo total de energia primária no Brasil aumentou cerca de um terço na última década (EIA, 2011). O aumento da produção doméstica de óleo foi uma meta em longo prazo do governo brasileiro e recentes descobertas de depósitos de óleo *offshore*, no pré-sal, podem transformar o Brasil em um dos maiores produtores de óleo no mundo. Com o acréscimo no volume de óleo produzido em 2010, o Brasil alcançou a 15ª posição entre os maiores produtores mundiais de petróleo (EIA, 2011; Anuário estatístico brasileiro de petróleo, 2011).

Para o pré-sal se tornar uma realidade, no entanto, será necessário o rompimento de uma enorme barreira tecnológica, com a superação de desafios como a profundidade de mais de 6.000 metros onde se encontram os reservatórios, as condições adversas de temperatura e pressão e a criação de uma nova logística de transporte de pessoas e produtos a uma distância de pelo menos 300 quilômetros da costa do país. O rompimento dessas barreiras implica em um grande custo operacional. Segundo o ex-presidente da Petrobras José Sergio Gabrielli, cada poço de extração no pré-sal custará em torno de US\$ 100 milhões para entrar em produção

e estimativas da própria empresa apontam para um gasto superior a US\$ 600 bilhões (45% do PIB do Brasil) para a recuperação de todo o petróleo da província do pré-sal.

Considerando esse cenário, é estratégico para o país o investimento na criação e aperfeiçoamento de tecnologias capazes de aumentar a eficiência de extração do petróleo e expandir as reservas tecnicamente exploráveis, tanto as da província do pré-sal quanto as demais reservas brasileiras. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade das células do isolado *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 em promover a recuperação de petróleo residual em sistemas porosos não-consolidados, assim como avaliar o efeito de variáveis ambientais nesse processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Recuperação melhorada de petróleo

A recuperação melhorada de petróleo (EOR – *Enhanced Oil Recovery*) é realizada por mecanismos que aumentam a movimentação e vazão de óleo no reservatório. Esses mecanismos são baseados em métodos térmicos, químicos, de miscibilidade e microbiológicos (McInerney et al., 2005).

Os térmicos estão entre os métodos de EOR mais utilizados em todo o mundo e tem como princípio a redução da viscosidade do óleo por meio da injeção de vapor ou de combustão interna controlada no reservatório.

Os métodos químicos baseiam-se na injeção de polímeros, para aumentar a viscosidade da água de injeção, ou de compostos surfactantes, ou ainda de agentes alcalinos que reduzem as forças capilares e as de tensão interfacial óleo-água para aumentar a mobilização do óleo.

Métodos de miscibilidade baseiam-se na injeção de gases miscíveis em óleo, como CO₂, cuja presença causa redução na viscosidade do petróleo, com consequente aumento de sua mobilização. Em geral, esses métodos ainda são pouco utilizados, fato atribuído à complexidade metodológica ou ao alto custo de implementação. Um exemplo disto é o fato de que somente cerca de 10 % de toda a produção americana de petróleo são provenientes da utilização de tais tecnologias (McInerney et al., 2005).

2.2. Recuperação de petróleo melhorada por micro-organismos

Dentre os mecanismos de EOR, a recuperação avançada de petróleo melhorada por micro-organismos (*Microbially Enhanced Oil Recovery*– MEOR) tem sido apontada como uma das técnicas mais promissoras para a otimização do aproveitamento das reservas de petróleo, inclusive em reservatórios com baixo nível de petróleo ou mesmo reservatórios “esgotados” (McInerney et al., 2004; Youssef et al., 2007).

As vantagens da MEOR são atribuídas ao fato de que esta não requer a aplicação de grandes quantidades de energia, como em processos térmicos, e também por não depender do preço do petróleo cru, ao contrário de muitos processos

químicos. Além disso, tem sido explorada a obtenção de produtos microbianos a partir da utilização de fontes renováveis e de baixo custo (Cameotra & Makkar, 1998; Nitschke et al., 2004; 2006; Barros et al., 2007a; Barros et al., 2007b; Rossmann, 2008).

A MEOR consiste no emprego dos próprios micro-organismos ou de metabólitos microbianos, como os biossurfactantes. Dentre os efeitos que podem ser alcançados com esse processo, merecem destaque: (i) a formação de gases (ex.: CO₂ e CH₄), com consequente aumento da pressão interna do reservatório e redução da viscosidade do óleo; (ii) a produção de ácidos (ex.: acético, butírico e láctico), que propicia a degradação da matriz de calcário e o aumento da liberação do óleo residual; (iii) a produção de solventes (ex.: etanol, butanol e acetona), os quais propiciam redução na viscosidade do óleo; (iv) a produção de polímeros (ex.: polissacarídeos, proteínas), que contribuem para o aumento da viscosidade da água de injeção; (v) a produção de bioemulsificantes (ex.: heteropolissacarídeos, proteínas), substâncias que promovem a emulsificação do óleo; (vi) a produção de biossurfactantes (ex.: glicolípídeos e lipopeptídeos), que reduzem a tensão interfacial óleo-rocha e óleo-água de injeção; (vii) a formação de biomassa microbiana, que promove bloqueio seletivo nas zonas de alta permeabilidade (Banat, 1995; McInerney et al., 2005).

2.3. Hidrofobicidade da superfície celular microbiana

Certas estirpes de bactérias são conhecidas por exercerem papéis críticos em aplicações relacionadas ao petróleo, como em MEOR e biorremediação. Quando injetadas em reservatórios de petróleo, essas estirpes bacterianas podem alterar as propriedades do óleo, como viscosidade, e facilitar o bombeamento ou mesmo produzir metabólitos que bloqueiem poros nas regiões de maior permeabilidade da rocha reservatório (Yen, 1990; Khire e Kham, 1994). Para que esses processos sejam eficientes, os fenômenos relacionados à transferência de massas devem ser considerados prioritários: uma vez que os micro-organismos cresçam em meios aquosos, o seu contato com hidrocarbonetos líquidos pode acontecer somente na interface óleo-água. Para maximizar este contato e melhorar a transferência de massa, algumas espécies têm a habilidade de emulsificar misturas óleo-água, criando emulsões óleo em água ou água em óleo (Zosim et al., 1989; Sar e Rosemberg,

1983). No entanto, alguns estudos demonstraram que determinadas células bacterianas intactas, que não estão se dividindo e não estão secretando biossurfactantes, comportam-se como partículas inanimadas, sendo capazes de estabilizar emulsões óleo em água ou água em óleo sem alterar a tensão interfacial (Dorobantu et al., 2004). A reunião dessas células na interface óleo-água pode levar à formação de uma camada em toda a superfície da gota de óleo (*surface skin*) e inibir a coalescência da gota, fenômeno similar ao de estabilização de emulsões por partículas sólidas (Yan et al., 2001; Dorobantu et al., 2004). A fixação de células bacterianas à interface hidrocarboneto-água requer que a superfície celular possua algum grau de hidrofobicidade, já que esta exerce influência sobre o grau e a força de aderência das células a substratos hidrocarbônicos também hidrofóbicos, fatores significantes na captação de hidrocarbonetos e na habilidade de degradá-los (Rosenberg e Kjellenberg, 1986; Diziel et al. 1999; Macleod e Daugulis, 2005).

A hidrofobicidade da superfície celular é influenciada por fatores diversos. As condições de crescimento são determinantes para a hidrofobicidade celular, a qual pode ser alterada em resposta à fase de crescimento do micro-organismo (Van Loosdrecht et al., 1987). Quando as células microbianas se aproximam da fase estacionária, elas tendem a aumentar a hidrofobicidade de sua superfície celular (Rosenberg et al., 1981; Kjelleberg e Hermansson, 1984; Hart e Vreeland, 1988). Além disso, a fonte de carbono e a concentração da mesma no meio de cultura podem provocar modificação da hidrofobicidade celular. Em condições de escassez de carbono, ocorre aumento da capacidade da superfície celular em se aderir a superfícies e moléculas hidrofóbicas, como as de hidrocarbonetos (Sanin et al., 2003). As alterações na hidrofobicidade normalmente são atribuídas a mudanças qualitativas e quantitativas dos componentes da superfície celular, sendo dependentes do nutriente limitante e do tempo em que as células permanecem em condições de desnutrição (Nozawa et al., 1980; Noyce e Hughes, 2003). Em células mantidas em água, em PBS e em meios de cultura com limitação de carbono, a hidrofobicidade tende a aumentar (Castellanos et al., 2000; Jana et al., 2000).

Em trabalhos que determinaram o efeito da desnutrição em meio com escassez de nitrogênio sobre a hidrofobicidade celular foi possível verificar que células de *Arthrobacter* (LBBMA 98 e LBBMA 201) sofreram pequena redução na hidrofobicidade da superfície celular, enquanto que as células da estirpe LBBMA 18 (não-identificada) mostraram diminuição acentuada da hidrofobicidade da superfície

celular. Por outro lado células de *Klebsiela* sp. LBBMA 204 não sofreram modificação na sua hidrofobicidade celular. Estes resultados sugerem que o efeito da condição nutricional da célula sobre a hidrofobicidade da mesma pode ser específico de acordo com cada espécie (Borges et al., 2008). O mesmo foi reportado por Fernandes (2011), no entanto as células utilizadas nesse estudo foram submetidas a uma pré-inoculação em diferentes meios onde a alteração da hidrofobicidade celular em resposta à manutenção em meio com carência de nitrogênio foi dependente da linhagem bacteriana e também da condição de cultivo prévio.

A inoculação de bactérias em meio com limitação de nutrientes promove severas modificações fisiológicas e alterações na composição da membrana e da parede celular (Nozawa et al., 1980; Noyce e Hughes, 2003; Kabir et al., 2004). Essas alterações na composição referem-se a mudanças na quantidade, qualidade e localização dos grupos funcionais presentes, como cetonas, ácidos carboxílicos, grupos carbonila, ligações peptídicas, ligações éter, grupos etano, hidrogênio e hidroxila. Quando o carbono é o nutriente limitante, o nitrogênio em excesso é direcionado à formação de proteínas e algumas dessas proteínas em excesso são encaminhadas aos polímeros de matriz extracelular (Durmaz e Sanin, 2001). Sabe-se que essas proteínas e aminoácidos são componentes hidrofóbicos de exopolímeros e a principal causa de aumento na hidrofobicidade da superfície celular (Dignac et al., 1998; Sanin et al., 2003).

A alta hidrofobicidade dos micro-organismos é normalmente associada à presença de proteínas específicas na parede celular (Singleton et al., 2001; Kos et al., 2003). No entanto a hidrofobicidade da superfície celular também pode ser atribuída a outros componentes da superfície da célula, como fímbrias e bioemulsificantes. A aderência de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 a n-hexadecano é mediada, em parte, pela presença de numerosas fímbrias finas em sua superfície, compostas de proteínas com alta proporção de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Rosemberg et al., 1982), sendo que, durante a fase de crescimento exponencial, há envolvimento também de um bioemulsificante associado à célula (emulsan), o qual é descartado no meio extracelular assim que a célula entra na fase estacionária (Pines et al., 1983).

A expressão “hidrofobicidade da superfície celular microbiana” é considerada freqüentemente como auto-explicativa. A palavra hidrofobicidade implica que a expressão deve se referir à aversão das células microbianas à água. No entanto, de todos os métodos experimentais para se avaliar a hidrofobicidade da

superfície celular microbiana, somente as mensurações de ângulo de contato (Van Loosdrecht et al., 1987) refletem diretamente o que a palavra hidrofobicidade expressa (Van der Mei et al. 1991). Outros métodos que têm por objetivo mensurar a hidrofobicidade da superfície celular são indiretos. Os métodos mais comuns são: partição em sistema aquoso de duas fases (Miorner et al., 1982), cromatografia de interação hidrofóbica (Jonsson e Wadstrom, 1983), agregação salina (Lindahl et al., 1981), adesão a micro-esferas de poliestireno (Hazen e Hazen, 1987) e adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH) (Rosenberg et al., 1980). No entanto, os métodos usados para se mensurar a hidrofobicidade da superfície microbiana não são consenso, visto que os valores de hidrofobicidade mensurada por tais métodos nem sempre se correlacionam (Dillon et al., 1986; Van der Mei et al., 1987; Mohanty e Mukherji, 2008).

MATH é um dos métodos mais comumente usados para se mensurar a hidrofobicidade da superfície de micro-organismos. O teste MATH é realizado usando-se *n*-hexadecano, *n*-octano, *p*-xileno ou tolueno como a fase hidrocarbônica. O teste MATH permite avaliar diretamente o comportamento das células microbianas em um sistema de duas fases líquidas e a interação das células com a fase orgânica, sendo afetado por interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals e interações eletrostáticas (Van der Mei et al., 1993; Van der Mei et al., 1995; Busscher et al., 1995; Ahimou et al., 2001), mas este método possui algumas vantagens, em especial quanto à simplicidade de execução e baixo custo. Além disso, os micro-organismos aderidos nas gotas de óleo podem ser observados microscopicamente e o teste pode ser usado para se observarem populações mistas da mesma espécie, como por exemplo, células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus* (Rosenberg e Kjelleberg, 1986).

2.4. O gênero *Acinetobacter*

Espécies do gênero *Acinetobacter* são bastonetes curtos gram-negativos, com dimensões de 0,9-1,6 por 1,5-2,5 µm durante a fase de crescimento logarítmico, que com frequência tornam-se mais arredondados na fase estacionária. As células normalmente ocorrem em pares, mas também em cadeias de comprimento variável. Neste gênero, não há formação de esporos, os flagelos são ausentes, no entanto, apesar de serem consideradas sem motilidade, elas se movimentam por “espasmos”

ou “deslizamento” em meios semi-sólidos. Muitas estirpes são capsuladas; as colônias são normalmente não-pigmentadas, mas algumas estirpes formam colônias brancas ou creme. Este gênero pertence à família *Moraxellaceae*, juntamente com *Moraxella* e *Psychrobacter* (Rossau et al., 1991; Barbe et al., 2004).

A maioria dos membros do gênero *Acinetobacter* é aeróbia estrita e pode crescer em uma ampla faixa de temperatura. A maioria das estirpes cresce a 33 °C, mas alguns isolados ambientais preferem a faixa de 20–30 °C. Isolados clínicos de *Acinetobacter* normalmente crescem a 37 °C e algumas estirpes crescem a 42 °C. Todas as bactérias do gênero *Acinetobacter* são oxidase negativas e catalase positivas. A reação oxidase negativa serve para distinguir *Acinetobacter* de outros gêneros relacionados (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996).

Acinetobacter é uma bactéria que possui elevada versatilidade nutricional e metabólica, além de facilidade de adaptação a diferentes ambientes (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996). As espécies mais comumente encontradas na natureza são: *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. iwoffii*, *A. radioresistens* e *Acinetobacter* genoespécie 3 (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996). Eles também são organismos ubíquos em ambientes clínicos e comensais da pele de pessoas que tem contato com estes ambientes. As espécies mais comumente encontradas como colonizadoras da pele humana são *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. iwoffii* e *A. radioresistens* (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996). Algumas estirpes de *Acinetobacter* são atualmente reconhecidas como agentes causais presumidos ou contributários em numerosos processos de doenças infecciosas (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996). *A. baumannii* é patógeno oportunista de importância nas infecções nosocomiais (Pantophlet et al., 2002) e clínicas, como pneumonias, infecções urinárias e meningites, especialmente em pacientes imuno-comprometidos (Dijkshoorn et al., 2007).

Bactérias do gênero *Acinetobacter* são usadas na remoção de fósforo em tratamentos de água residuária (Wagner et al., 1994). Muitos isolados ambientais mostram capacidades de degradar hidrocarbonetos de petróleo, sendo, portanto, de interesse em processos de biorremediação de ambientes impactados com essa classe de contaminantes. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Rosemberg et al., 1979), *Acinetobacter* sp. M-1 (Tani et al., 2001), *Acinetobacter* sp. ODDK71 (Koma et al., 2001) e *Acinetobacter calcoaceticus* spp. C3, C4 e B1/II (Di Cello et al., 1997) são capazes de degradar n-alcenos C20 a C44, enquanto que *Acinetobacter*

radioresistens S13 possui a capacidade degradar poluentes aromáticos (Caposio et al., 2002). Além da habilidade em utilizar uma variedade de poluentes orgânicos como fonte de carbono, muitas espécies produzem bioemulsificantes extracelulares (Navon-Venezia et al., 1995). A maioria dos bioemulsificantes isolados e caracterizados mostra uma composição onde a fração protéica é parte do complexo emulsificante que contém um esqueleto polissacarídeo (Bach e Gutnick, 2004). Muitas espécies de *Acinetobacter* produzem bioemulsificantes; alguns exemplos são *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 que produz o bioemulsificante Emulsan (Gutnick et al., 1980), *A. radioresistens* produz o Alasan (Navon-Venezia et al., 1998), *A. calcoaceticus* BD4 produz uma grande cápsula polissacarídea que, sobre certas condições de crescimento, é liberada junto com a proteína ligada a ela, produzindo um complexo emulsificante altamente ativo (Kaplan e Rosemberg, 1982). Diversas proteínas microbianas exercem papel na emulsificação, tanto por aumentar a atividade emulsificante em complexos proteína-polissacarídeo ou por comportarem-se como emulsificantes por si só (Shabtai e Gutnic, 1985; Kaplan et al., 1987; Toren et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolado bacteriano

Acinetobacter sp. LBBMA LU1 foi isolada a partir de composto de resíduo sólido urbano contaminado com diesel (Fernandes, 2011) e conservada em caldo TSB a -80 °C no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Avaliação da hidrofobicidade de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 em caldo TSB suplementado com glicose

Acinetobacter sp. LBBMA LU1 foi cultivada em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de caldo trípico de soja (TSB) suplementado com 0, 5, 10 ou 20 g L⁻¹ de glicose, em duplicata. Os frascos foram inoculados com 3 mL de uma cultura da bactéria em crescimento em caldo TSB sob agitação de 200 rpm por 18 horas a 35 °C (New Brunswick Scientific – C25KC). Os frascos foram incubados por 72 horas sob as mesmas condições. As células foram coletadas por centrifugação a 4 °C e 14.000 g por 20 minutos (Jouan – MR23i), seguindo-se duas lavagens do pélete em solução salina e ressuspensão em tampão fosfato salino (PBS) a 10 mmol L⁻¹ (8 g L⁻¹ de NaCl, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄), ajustado para pH 7,4.

3.2.1. Avaliação da hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade da superfície das células foi avaliada pelo método de adsorção microbiana a hidrocarbonetos (MATH) (Sanin et al., 2003), com modificações. Para as avaliações foram utilizados tubos de ensaio de 100 mm x 15 mm, previamente tratados a 500 °C em mufla (Quimis – 318M26), por três horas, para remoção de contaminantes orgânicos. Para cada tubo foram transferidos 3 mL de suspensão de células, com D.O.₄₄₀ (inicial) ajustada para 1,2. A seguir, a suspensão foi recoberta com 0,3 mL de n-hexadecano. Os tubos foram mantidos por 15 minutos a 30 °C em banho-maria, agitados a 3.000 rpm por 2 min em agitador de tubos digital (Fisher Scientific - Digital Vortex Mixer) e, após repouso por 15

minutos, foi determinada a D.O.₄₄₀ (final) da fase inferior. O experimento foi conduzido em triplicata.

A capacidade de adsorção das células a hidrocarbonetos (MATH) foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{MATH (\%)} = [1 - \text{D.O.}_{440} (\text{final}) / \text{D.O.}_{440} (\text{inicial})] \times 100.$$

3.2.2. Avaliação da atividade de emulsificação de óleo das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 e estabilidade da emulsão

A atividade de emulsificação de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 crescidas em caldo TSB com distintas concentrações de glicose foi avaliada utilizando-se quatro tipos de óleo (óleo de soja, n-hexadecano, óleo de oliva e óleo de canola). Quatro mililitros da suspensão de células em PBS (D.O.₆₀₀ = 4) foram misturados a 4 mL de óleo em um tubo de vidro de 100 mm x 15 mm, seguindo-se agitação em vortex digital (Fisher Scientific - Digital Vortex Mixer) a 3000 rpm por 2 minutos. Os tubos foram colocados em repouso por 24 horas a temperatura ambiente (25 °C). A emulsão foi considerada estável quando o volume da camada emulsificada correspondeu a 50 % ou mais do volume total de líquido após 24 horas de incubação (Cooper e Goldenberg, 1987). As avaliações foram conduzidas em duplicata.

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

$$\text{E24 (\%)} = \frac{\text{Volume da camada emulsificada (mm}^3\text{)} \times 100}{\text{Volume total de líquido}}$$

3.3. Efeito da idade da cultura na hidrofobicidade das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 durante o crescimento em meio de cultura TSB adicionado de glicose

O inóculo de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 foi preparado em frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do caldo TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose, o qual foi incubado por 16 horas a 35° C sob agitação a 200 rpm em incubadora (New Brunswick Scientific – C25KC). A seguir, 3 mL do inóculo foram transferidos para frascos erlenmeyer de um litro contendo 600 mL de caldo TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose. Os frascos foram incubados sob as mesmas

condições do inóculo. A partir do tempo zero, foram retiradas alíquotas de 2 mL a cada duas horas durante as primeiras 24 horas para determinação da D.O.₆₀₀ em espectrofotômetro (BioRad SmartSpecTM 3000) e, a partir de então, a cada 24 horas até se completarem 96 horas de incubação. Os dados de D.O.₆₀₀ foram utilizados para obtenção da curva de crescimento da bactéria.

Para a avaliação da hidrofobicidade das células foram utilizadas alíquotas de 50 mL das culturas, retiradas a cada duas horas após a oitava hora de crescimento durante as primeiras 24 h de crescimento e, a partir de então, a intervalos de 24 horas, até se completarem 96 horas de incubação. As alíquotas de 50 mL foram submetidas à centrifugação a 4°C e 14.000 g por 20 minutos em centrífuga (Jouan – MR23i). O pélete foi ressuspendido em solução salina e novamente submetido à centrifugação para lavagem das células por duas vezes. As células lavadas foram ressuspendidas em solução PBS, pH 7,4 para a determinação da hidrofobicidade da superfície das células (Sanin et al., 2003).

3.4. Influência da concentração de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

3.4.1. Preparação dos sistemas porosos não-consolidados

Os sistemas porosos não-consolidados foram preparados em colunas de vidro de 2,5 x 10 centímetros (Kontes Flex Column, Fisher Scientific K420401-2510). Três colunas foram tratadas por vez. As colunas foram empacotadas com 60 g de areia de praia previamente lavada em solução de ácido clorídrico a 2 mol L⁻¹ e aquecida em mufla (Quimis – 318M26) a 600 °C por seis horas, a fim de se eliminarem resíduos de compostos orgânicos. O meio poroso em cada coluna foi saturado com água deionizada para a remoção do ar, seguindo-se a injeção de 6,5 mL de petróleo cru com viscosidade correspondente a 15 cp, o que correspondeu a 50 % do volume poroso total da coluna. As colunas receberam novas injeções de água deionizada até se obter a saturação residual de óleo, ou até ser injetado um volume de água correspondente a 10 volumes de poro (VP) da coluna. Após esse procedimento, o qual simula a recuperação secundária de petróleo, a coluna foi considerada como pronta para se realizar o procedimento de injeção de suspensões com diferentes concentrações de células.

3.4.2. Quantificação do volume de petróleo retido no sistema poroso não-consolidado após a injeção de suspensões de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1

O volume de petróleo retido no sistema poroso não-consolidado após o tratamento de injeção das células foi quantificado utilizando-se a técnica de extração por solvente (Urum et al., 2004). O eluato foi coletado em funil de separação, para subsequente drenagem da água após a separação das fases. O petróleo retido no funil de separação foi extraído com 40 mL de n-Hexano (Urum et al., 2004). Esse mesmo volume do solvente foi utilizado para remover o petróleo residual da areia após a desmontagem do sistema poroso não-consolidado.

O volume de petróleo presente em cada solução de óleo dissolvido em n-hexano foi calculado comparando-se o valor da A_{450} (absorvância) da solução, determinado em espectrofotômetro (BioRad SmartSpec™ 3000), com os valores de uma curva de calibração de óleo em n-hexano.

3.4.3. Recuperação de petróleo residual de sistema poroso não-consolidado após injeção de células hidrofóbicas de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1

Células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, obtidas após o cultivo em meio TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose a 35 °C e 200 rpm por 72 horas, foram utilizadas para se determinar o efeito da concentração de células na suspensão injetada nos sistemas porosos não-consolidados sobre a remoção do petróleo residual. As células foram coletadas por centrifugação (Jouan – MR23i), a 4°C e 14.000 g por 20 minutos. Após a lavagem em salina por duas vezes, o pélete foi ressuspenso em PBS a 10 mM L⁻¹ (pH 7,4) e a concentração foi ajustada para se obterem suspensões celulares com valores de D.O.₆₀₀ = 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0. Volumes correspondentes a 52 mL de cada uma das suspensões foram mantidos em banho-maria a 30°C por 15 minutos, antes da injeção nos sistemas porosos sob fluxo contínuo de 0,30 mL min⁻¹. As suspensões foram agitadas a cada 30 minutos, durante o processo de injeção na coluna. As células utilizadas apresentavam valores de hidrofobicidade superiores a 75%, de acordo com o teste MATH.

As colunas com o sistema poroso não-consolidado foram acopladas a uma bomba peristáltica (Master flex ®L/S® Cole-Parmer – 7523-90) e mantidas a 30 °C em estufa com ventilação forçada (Tecnal TE-394/3). As suspensões de

Acinetobacter sp. LBBMA LU1 foram injetadas em volume correspondente a 4 volumes porosos, seguindo-se injeção do equivalente a um volume de água deionizada. Para cada uma das concentrações de células, foram utilizadas simultaneamente duas colunas, constituindo as duas repetições por tratamento.

3.4.4. Recuperação de petróleo residual de sistema poroso não-consolidado pela injeção de células hidrofílicas de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1

As células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 foram obtidas após cultivo em meio TSB sob as condições descritas no item 3.3 e ressuspensas em PBS (pH 7,4). As células foram armazenadas sob refrigeração (4-6 °C) durante um mês, determinando-se, em seguida, o valor de hidrofobicidade pelo método MATH. As células apresentaram um valor MATH = 15 %, sendo, portanto consideradas hidrofílicas. A concentração de células na suspensão foi ajustada para uma D.O.₆₀₀ = 5,0 em PBS (pH 7,4), sendo o tratamento controle constituído de suspensão de células hidrofóbicas (MATH = 75 %). As colunas com os sistemas porosos não-consolidados foram acopladas à bomba peristáltica e submetidas ao mesmo procedimento descrito no item 3.4.3.

3.4.5. Efeito da integridade de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

Células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, obtidas conforme descrito no item 3.4.3, foram ressuspensas em PBS (pH 7,4), em concentração correspondente a uma D.O.₆₀₀ = 5,0 e autoclavadas a 121 °C por 20 minutos. As colunas com os sistemas porosos não-consolidados foram acopladas à bomba peristáltica e submetidas ao mesmo procedimento descrito no item 3.4.3.

3.4.6. Efeito do pH e da salinidade da suspensão de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

A influência do pH da suspensão de células (D.O.₆₀₀ = 5,0) na recuperação do óleo residual foi avaliada ajustando-se o pH da solução de ressuspensão com NaOH para valores de 8,5 e 9,5. Os resultados foram comparados aos obtidos em pH 7,4.

O efeito da salinidade do líquido de injeção foi avaliado adicionando-se NaCl na concentração final de 50 ou 100 g L⁻¹ à suspensão de células em PBS a 10 mM L⁻¹ pH 7,4 (D.O.₆₀₀ = 5,0). As colunas com os sistemas porosos não consolidados foram acopladas à bomba peristáltica e submetidas aos procedimentos descritos anteriormente (item 3.4.3).

3.5. Análises estatísticas

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, quando necessário, 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. Os dados experimentais foram apresentados como médias aritméticas de duas ou três repetições, sendo os desvios-padrão mostrados pelas barras de erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da hidrofobicidade de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 em caldo TSB suplementado com glicose

A adição de glicose ao meio TSB aumentou a hidrofobicidade das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, a qual passou de 65,5%, no meio sem glicose, para 77,0% quando as células foram cultivadas no meio com a fonte adicional de carbono até 10 g L⁻¹ (Figura 1). Uma vez que a hidrofobicidade das células no meio de cultura TSB adicionado de 5 ou 10 g L⁻¹ de glicose não diferiu, foi adotado o acréscimo de 5 g L⁻¹ de glicose ao meio TSB para a obtenção de células com alto valor de hidrofobicidade, para serem usadas nas demais etapas do trabalho. A adição de 20 g L⁻¹ glicose apresentou efeito oposto ao observado com as demais concentrações avaliadas, resultando em decréscimo da hidrofobicidade celular. Os dados são explicados por uma equação polinomial de segundo grau (Figura 1).

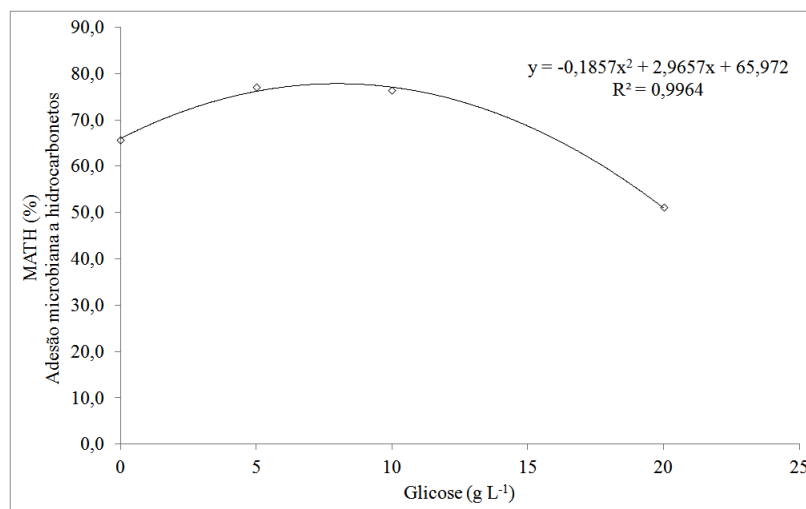


Figura 1. Hidrofobicidade de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 cultivadas por 72 horas a 35°C e 200 rpm em caldo TSB adicionado de glicose, mensurada pelo teste de adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH) (Sanin et al., 2003), empregando-se hexadecano como fase apolar.

4.2. Avaliação da atividade de emulsificação de óleo das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 e estabilidade da emulsão

A adição de glicose em diferentes concentrações ao meio TSB resultou na obtenção de células com maior capacidade de formação de emulsões estáveis com os óleos vegetais de soja (Figura 2A), de oliva (Figura 2D) e com hexadecano (Figura B). Os volumes máximos de emulsões estáveis foram alcançados com células obtidas em TSB com suplementação de 5 g L⁻¹ de glicose, quando os valores de emulsificação corresponderam a E₂₄ de 74 % com óleo de soja (Figura 2A), E₂₄ de 76 % com o hexadecano (Figura 2B) e E₂₄ de 63,0 % com óleo de oliva (Figura 2D). Com o óleo de canola, as emulsões mostraram-se estáveis em todos os tratamentos testados. Porém, a adição de 5 g L⁻¹ de glicose proporcionou a estabilização de um maior volume de emulsão, com E₂₄ de 84 %. Os demais tratamentos com 10 ou 20 g L⁻¹ de glicose e o controle (0 g L⁻¹ de glicose) apresentaram E₂₄ de 79 %, 79 % e 77 %, respectivamente (Figura C).

As emulsões obtidas nesse experimento podem estar relacionadas à presença de bioemulsificantes, uma vez que a maioria das estirpes de *Acinetobacter* possui a habilidade de produzir compostos de alta massa molecular com ação emulsificante, a exemplo de polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou uma mistura complexa desses biopolímeros (Sar e Rosemberg, 1983). Além disso, existem estirpes de *Acinetobacter* que se comportam como sólidos coloidais com capacidade de estabilizar emulsões, simplesmente em resposta às características hidrofóbicas de sua membrana (Kang et al., 2008). No entanto, deve ser ressaltado que os isolados crescidos em meio suplementado com 5 ou com 10 g L⁻¹ de glicose apresentaram uma hidrofobicidade apenas ligeiramente superior ao controle (Figura 1), o que indica que a hidrofobicidade pode não ser o único fator responsável pela formação e estabilização das emulsões aqui apresentadas. Essa observação é reforçada pelo fato de que a estabilidade das emulsões obtidas com células cultivadas em meio suplementado com 20 g L⁻¹ de glicose foi significativamente superior à obtida com as células do tratamento-controle (Figuras 2A, 2B e 2D), a despeito de apresentarem, em relação a essas, menor hidrofobicidade (Figura 1).

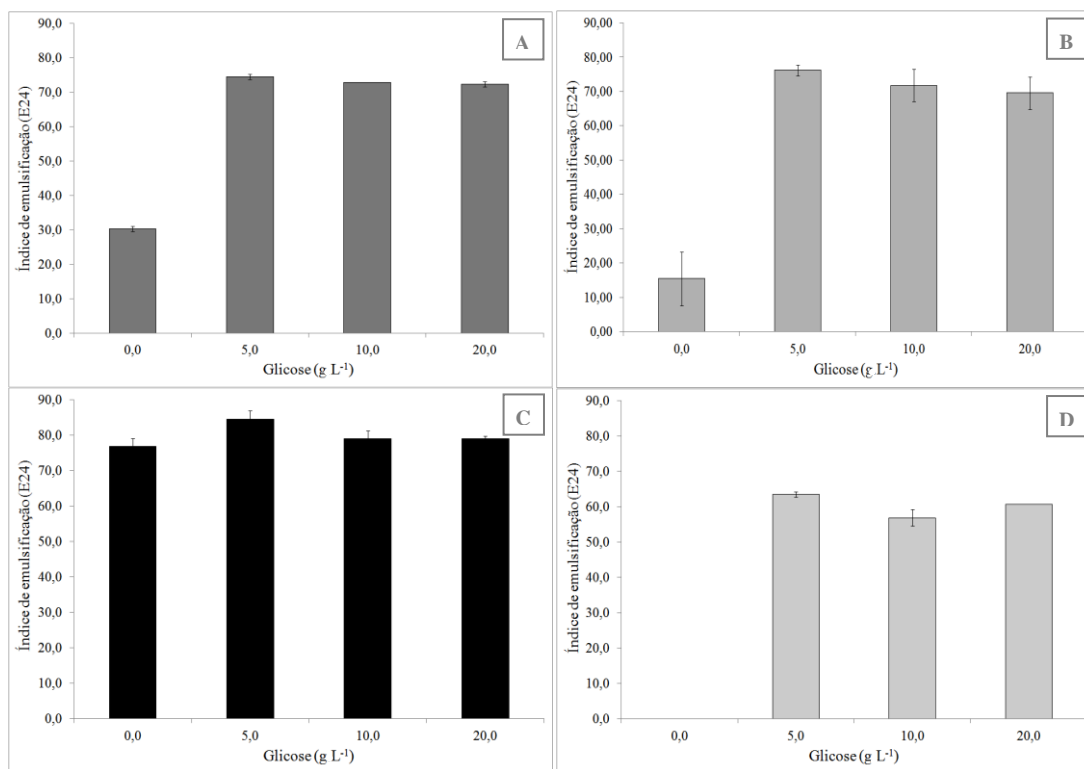


Figura 2. Índice de emulsificação (E₂₄) das suspensões formadas entre suspensões de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 e diferentes óleos; A = óleo de soja; B = hexadecano; C = óleo de canola; D = óleo de oliva. As células foram cultivadas em caldo TSB a 35°C e 200 rpm por 72 horas. As linhas sobre as barras indicam o desvio-padrão da média de 2 repetições.

4.3. Efeito da idade da cultura na hidrofobicidade das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 durante o crescimento em meio de cultura TSB adicionado de glicose

A maior concentração de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 em meio TSB adicionado de glicose é obtida em cerca de 40 horas de crescimento, nas condições avaliadas (35 °C, 200 rpm) (Figura 3).

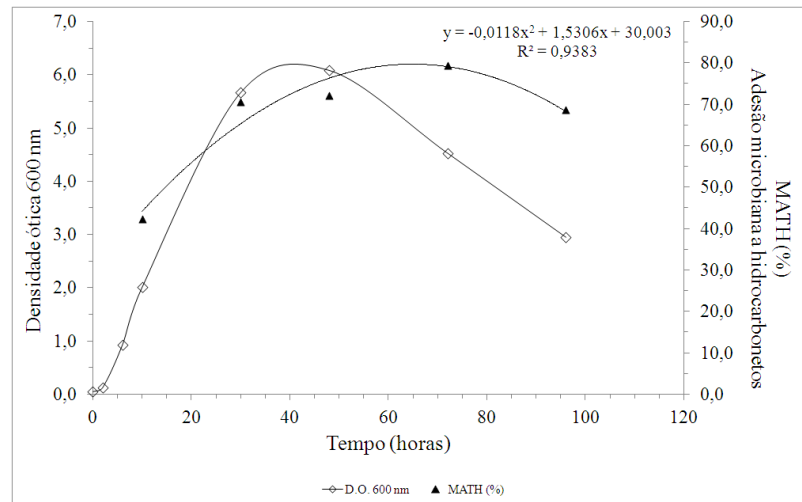


Figura 3. Crescimento e hidrofobicidade celular de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 em TSB suplementado com glicose a 5 g.L^{-1} . As culturas foram cultivadas por 96 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm. A hidrofobicidade foi mensurada pelo teste de adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH) (Sanin et al., 2003), empregando-se o n-hexadecano como fase apolar.

A hidrofobicidade celular aumentou linearmente nas primeiras horas do crescimento (Figura 4), tendendo a estabilizar após cerca de 16 horas do início do cultivo. O maior valor de hidrofobicidade das células, cerca de 79,4 % (Figura 3), foi obtido após 72 h de crescimento, quando a cultura já havia cessado seu crescimento e entrado na fase de morte celular. A cinética de alteração da hidrofobicidade de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 corrobora o relato de outros autores, ou seja, de que a hidrofobicidade da superfície celular aumenta com a aproximação da fase estacionária (Rosenberg et al., 1981; Kjelleberg e Hermansson 1984; Hart e Vreeland, 1988). Alguns estudos têm ainda demonstrado que a manutenção de células em água, em PBS ou em meios de cultura com limitação de carbono leva ao aumento da hidrofobicidade celular (Castellanos et al., 2000; Jana et al., 2000; Sanin et al., 2003). No entanto, no presente trabalho verificou-se que o acréscimo de glicose levou ao aumento da hidrofobicidade celular, o que contrasta com o resultado obtido por Sanin e colaboradores (2003).

As alterações na hidrofobicidade da superfície celular bacteriana normalmente são atribuídas a mudanças qualitativas e quantitativas dos componentes da superfície celular, sendo essas mudanças dependentes do nutriente limitante e do tempo em que as células permanecem em desnutrição. A inoculação de bactérias em meio com limitação de nutrientes promove severas modificações

fisiológicas e alterações na composição da membrana e da parede celular (Nozawa et al., 1980; Noyce e Hughes, 2003; Kabir et al. 2004). Essas alterações na composição referem-se a mudanças na quantidade, qualidade e localização dos grupos funcionais presentes, como cetonas, ácidos carboxílicos, grupos carbonila, ligações peptídicas, ligações éter, grupos etano, hidrogênio e hidroxila. Quando o carbono é o nutriente limitante, o nitrogênio em excesso é direcionado à formação de proteínas e algumas dessas proteínas em excesso são encaminhadas aos polímeros de matriz extracelular (Durmaz e Sanin, 2001). Essas proteínas e aminoácidos são componentes hidrofóbicos de exopolissacarídeos, e, portanto, causam o aumento na hidrofobicidade da superfície celular (Dignac et al., 1998; Sanin et al., 2003). Outro fator que pode estar relacionado ao aumento da hidrofobicidade é a possível presença de fímbrias e a putativa produção de bioemulsificantes, visto que a aderência de *A. calcoaceticus* RAG-1 ao n-hexadecano ocorre em razão da presença de numerosas fímbrias em sua superfície, compostas por proteínas com uma alta proporção de aminoácidos com resíduos hidrofóbicos (Rosemberg et al., 1982). Essa espécie e outras pertencentes ao gênero *Acinetobacter* produzem bioemulsificantes associados à célula formando uma minicápsula, a qual torna a superfície celular hidrofóbica, permitindo com que tenha acesso às gotas de óleo, deixando-a biodisponível por meio da formação de emulsões estáveis (Choi et al., 1996).

A menor hidrofobicidade das células após 96 horas de incubação (MATH = 68,5 %), quando comparada ao maior valor de hidrofobicidade (MATH = 79,4%) após 72 horas de cultivo (Figura 4), foi atribuído a um possível início de degradação do(s) composto(s), ainda não-identificado (s), responsável (eis) pelo aumento da hidrofobicidade nas fases mais tardias do crescimento.

4.4. Experimentos de recuperação de petróleo residual

4.4.1. Influência da concentração de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

O percentual médio de recuperação de óleo após o tratamento com a água, a qual simula a recuperação secundária, foi de 17% do volume originalmente presente nas colunas. Os dados de percentual de petróleo residual retido na coluna após a injeção

de células hidrofóbicas (MATH = 75 %) de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, em quatro concentrações distintas, se ajustaram a modelo de equação de terceiro grau (Figura 4). A injeção das suspensões de células nas colunas reduziu a saturação residual de óleo, sendo o percentual de óleo retido dependente da concentração de células na suspensão. No tratamento com suspensão de células com D.O.₆₀₀ = 10,0, apenas 26,0 % do óleo residual permaneceram retidos no núcleo poroso. No tratamento com a suspensão de células com D.O.₆₀₀ = 20, o percentual de óleo retido foi de 22 % do volume de óleo residual. Esses resultados foram atribuídos à capacidade das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 formarem emulsões estáveis com o óleo, em razão das características hidrofóbicas da superfície das células, bem como à putativa produção de bioemulsificantes que podem ficar adsorvidos à célula na forma de mini-cápsulas, auxiliando na formação de emulsões e conseqüentemente na recuperação de petróleo. O volume de óleo total recuperado com as etapas de recuperação secundária (injeção de água) e terciária (injeção de células de *Acinetobacter* sp., nos melhores tratamentos (suspensões celulares com D.O. 600 = 10,0 ou 20,0)) correspondeu a mais de 80% do volume de óleo originalmente contido nos núcleos porosos. Esse resultado é consideravelmente superior ao que é alcançado nas operações de recuperação de petróleo, as quais propiciam recuperação entre 10% e 40% do volume de óleo contido em um reservatório (Van Hamme et al., 2003; McInerney et al., 2005). O efeito da injeção de células do isolado microbiano utilizado neste trabalho é também superior aos resultados de outros estudos em MEOR. Como exemplo, Dastgheib et al. (2008), trabalhando com emulsificantes produzidos por espécies de *Bacillus*. Nesse trabalho foi observada a recuperação de 78,7% do óleo originalmente presente em colunas de areia após o tratamento com água e emulsificantes, porém, somente a água foi capaz de recuperar 57% de todo o hidrocarboneto. Em outro trabalho, Joshi et al (2008) obtiveram uma recuperação de 25 a 33% do óleo residual presente em núcleos porosos de areia após a injeção de biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus*.

A função mais importante de um emulsificante é prover forças repulsivas entre as gotas dispersas e, portanto, prevenir a coalescência e a subseqüente separação de fases. Se, além disso, as substâncias adsorvidas interagirem fortemente umas com as outras na interface, as propriedades reológicas, como elasticidade e viscosidade, podem aumentar. Essas propriedades reológicas podem influenciar o

transporte de gotas individuais, bem como o de toda a suspensão. Algumas bactérias são capazes de emulsificar hidrocarbonetos por meio da fixação à interface óleo-água mediada por interações hidrofóbicas gerais, não sendo o fenômeno atribuído a um reconhecimento específico do substrato (Cooper et al., 1982; Van Loosdrecht, 1987; Dorobantu et al., 2004). Neste caso, bactérias hidrofóbicas podem comportar-se como partículas sólidas coloidais, similares à argila e a nanoesferas, as quais são capazes de formar emulsões estáveis (Binks, 2002; Aveyard et al., 2003). Essas partículas podem interagir lateralmente umas com as outras e levar ao aumento da elasticidade e da viscosidade, o que pode aumentar a habilidade das emulsões em bloquear as vias mais permeáveis ao fluido deslocador em meios porosos (Dorobantu et al., 2004). A tenacidade da ligação das partículas (neste caso, das bactérias), que se comportam como partículas coloidais, à interface óleo-água, dão origem a camadas adsorvidas que se comportam como fortes barreiras estéricas, explicando assim a estabilidade das emulsões resultantes. Neste caso, a bactéria adsorvida funciona como um emulsificante. Assim, além de prover a estabilidade da emulsão, a bactéria adsorvida também afeta de modo significativo as propriedades de transporte das gotas emulsionadas, por conduzir a passagem da suspensão emulsionada por canais inexplorados (Kang et al., 2008), auxiliando na recuperação de petróleo. Trabalhos utilizando duas estirpes hidrofóbicas como sólidos coloidais, *Acinetobacter venetianus* e *Rhodococcus erythropolis*, demonstraram que elas funcionaram como estabilizadoras de emulsões por se adsorverem à interface óleo-água. A presença das células bacterianas proporcionou, também, maior elasticidade às emulsões, eliminando a instabilidade capilar em poros estreitos (Kang et al., 2008). Esse mecanismo é importante para aplicações em MEOR, uma vez que a capacidade das gotas emulsificadas de bloquear determinados canais de poros é fortemente aumentada.

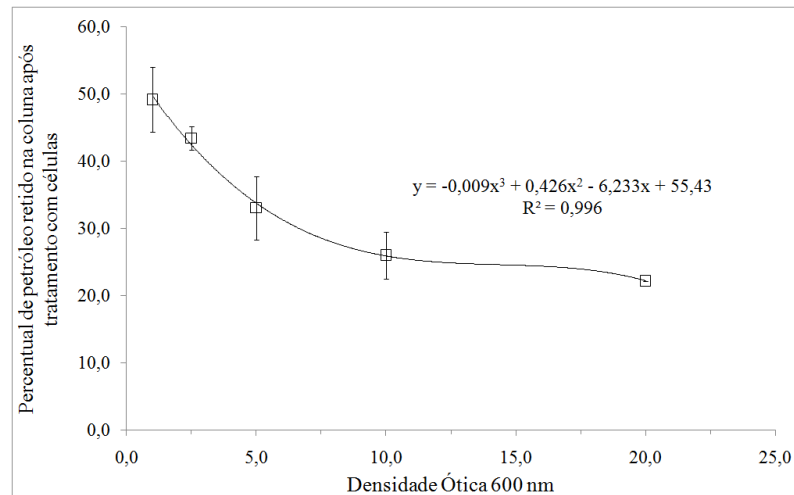


Figura 4. Percentual de petróleo retido em meios porosos não-consolidados após tratamento com suspensões de células do isolado *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 em diferentes concentrações. A bactéria foi cultivada em TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose por 72 horas a 35 °C e a 200 rpm. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água, a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da suspensão de células com D.O.₆₀₀ = 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 e com hidrofobicidade média de 75 %. O experimento foi conduzido a 30 °C. O percentual médio de óleo residual após o tratamento com a água foi de 83 %. As linhas sobre os marcadores indicam o desvio-padrão da média de 2 repetições.

4.4.2. Recuperação de petróleo residual de sistema poroso não-consolidado pela injeção de células hidrofílicas de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1

O percentual médio de óleo residual após o tratamento com água foi de 76,7 %. Após a injeção de células hidrofílicas (MATH = 15 %), 42 % do óleo residual permaneceram retidos na coluna, enquanto que após a injeção de células hidrofóbicas (MATH = 75 %), apenas 33 % do óleo residual permaneceram retidos. No entanto, o percentual de óleo retido após a injeção dos dois tratamentos não diferiu estatisticamente ($p = 0,122$) (Figura 5). Como as células hidrofílicas também promoveram a mobilização do óleo, acredita-se que tenha ocorrido formação de emulsões estáveis também por células menos hidrofóbicas, como evidenciado anteriormente (Figura 1 e Figura 2). Desta forma, conclui-se que a hidrofobicidade celular não é o único fator a definir a capacidade das células em promover o aumento da recuperação do petróleo.

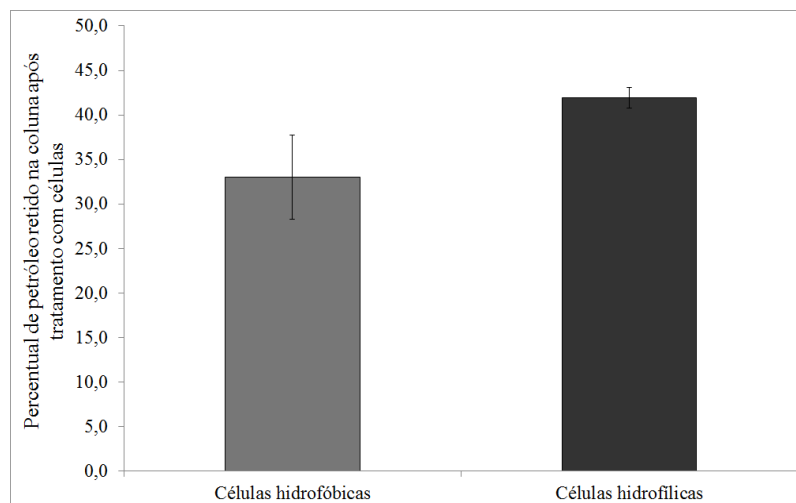


Figura 5. Petróleo retido em núcleos porosos não-consolidados após tratamento com suspensões de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 hidrofóbicas (MATH = 75 %) ou hidrofílicas (MATH = 15 %), ajustadas a uma $D.O_{600} = 5,0$. As células foram obtidas após cultivo em TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose por 72 horas a 35 °C e a 200 rpm. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água, a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da suspensão de células ressuspendidas em PBS pH 7,4+ 1 VP de água. O experimento foi conduzido a 30 °C. O percentual médio de óleo residual após o tratamento com água foi de 76,7 %. As linhas sobre as barras indicam o desvio-padrão da média de 2 repetições. Os tratamentos não foram considerados significativos pelo teste F com 5 % de probabilidade ($p = 0,122$).

4.4.3. Efeito da integridade de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

O percentual médio de óleo residual após o tratamento com a água foi de 87,6 %. O percentual de petróleo retido após a injeção da suspensão de células autoclavadas de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 foi 63 %, enquanto que, após a injeção de células íntegras do mesmo micro-organismo, que não foram submetidas à autoclavagem, foi cerca de 52 %. A recuperação do petróleo retido nos núcleos porosos não-consolidados, após a injeção dos dois tratamentos, não diferiu estatisticamente ($p = 0,307$) (Figura 6), indicando que a integridade celular não é essencial para a ação das células no processo de mobilização do óleo. No entanto, há uma tendência de perda de eficiência dessas células após a autoclavagem, que pode ser identificada pelo maior percentual de petróleo retido após a injeção da suspensão de células autoclavadas (63 %), em comparação com o resultado obtido com o

controle (52 %). Especula-se que tenha ocorrido destruição parcial de compostos ou superfícies envolvidos na mobilização do petróleo durante a autoclavagem, como por exemplo, a desnaturação de proteínas hidrofóbicas presentes na superfície celular ou a lise das células, de forma a impossibilitar a formação de emulsões e reduzindo, conseqüentemente, a recuperação de petróleo.

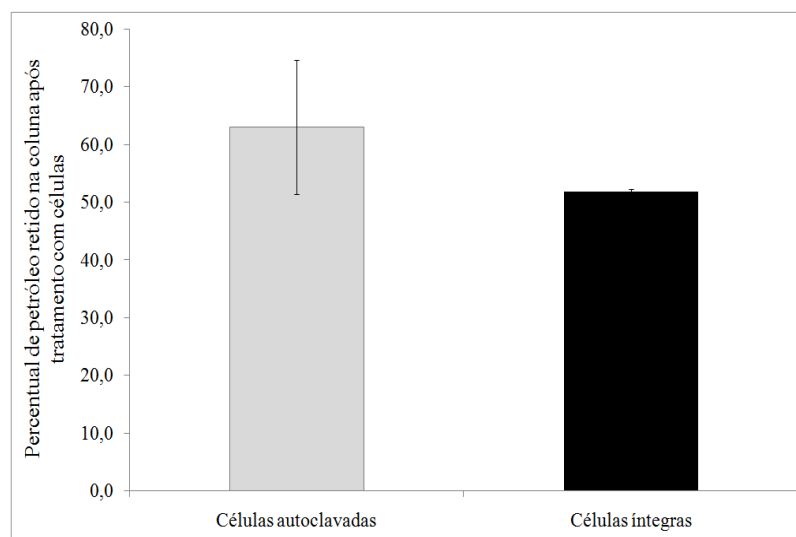


Figura 6. Percentual de petróleo retido na coluna após tratamento com suspensões de células hidrofóbicas de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 (MATH = 75 %) submetidas à autoclavagem e células íntegras. As células ($D.O_{600} = 5,0$) foram obtidas após crescimento em TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose por 72 horas a 35 °C e a 200 rpm. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água, a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da suspensão de células ressuspendidas em PBS pH 7,4+ 1 VP de água. O experimento foi conduzido a 30 °C. O percentual médio de óleo residual após o tratamento com a água foi de 87,6 %. As linhas sobre as barras indicam o desvio-padrão da média de 2 repetições. Os tratamentos não foram considerados significativos pelo teste F com 5 % de probabilidade ($p = 0,307$).

4.4.4. Efeito do pH da suspensão de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

A avaliação da influência do pH na recuperação de petróleo demonstrou variações consideráveis no percentual de petróleo retido nas colunas após o tratamento com suspensões de células hidrofóbicas ($D.O_{600} = 5,0$), com valores de pH 7,4 (controle); 8,5 e 9,5 (Figura 7). O menor percentual de petróleo retido (33 %) na coluna foi obtido com a suspensão de células com o pH de 7,4 (tratamento-

controle). O percentual de petróleo retido na coluna tratada com a suspensão de células em pH 8,5 (67 %) foi significativamente superior ao controle ($p = 0,021$). Não houve diferença significativa entre o percentual de petróleo retido na coluna tratada com a suspensão de células com o pH 9,5 (51 %) e o obtido nos demais tratamentos. Apesar de não ter diferido estatisticamente, foi observado que o aumento do pH para 9,5 resultou em um menor valor absoluto de óleo retido na coluna, quando comparado ao tratamento com pH 8,5. Esse resultado pode estar relacionado simplesmente com a maior concentração de NaOH no tratamento com maior valor de pH, o qual promove a redução da tensão interfacial e a mobilização de petróleo (Rudin e Wasan, 1992).

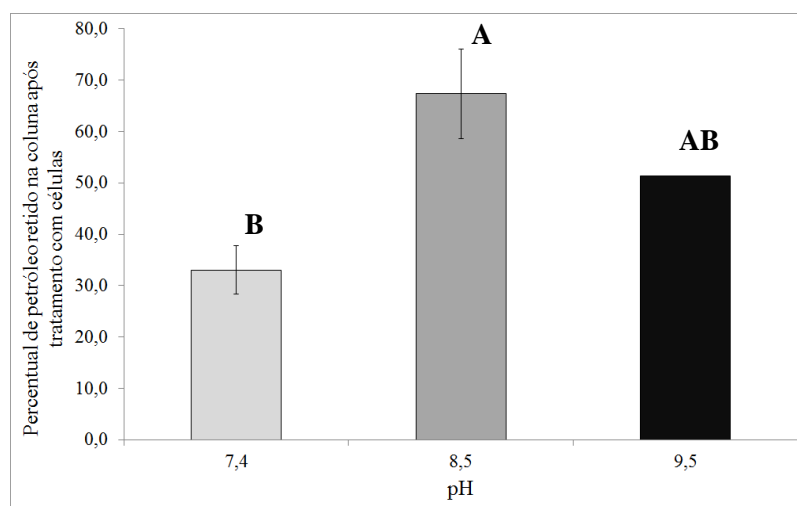


Figura 7. Percentual de petróleo retido na coluna após a injeção da suspensão de células hidrofóbicas (MATH = 75%) aferidas aos pHs 8,5 9,5 ajustadas à $DO_{600} = 5,0$ de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, crescido em TSB suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose por 72 horas a 35 °C sob agitação a 200 rpm. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da suspensão de células ressuspendidas em PBS pH 7,4 + 1 VP de água. O experimento foi conduzido a 30 °C. O percentual de óleo residual após o tratamento com a água foi em média 88%. As linhas sobre as barras indicam o desvio-padrão da média de 2 repetições.

Kim e colaboradores (2008) concluíram que o pH é um fator determinante no transporte de células de *Escherichia coli* através de um sistema poroso composto por areia. Os autores relatam recuperação de cerca de 3 % da massa celular após a injeção de fluido com pH de 6,0 ou 7,0, e de até 78,0 % quando o pH da suspensão

foi de 8,0 ou 9,0. Uma vez que as células microbianas apresentam carga negativa em valores de pH acima de 2,0 ou 3,0 (Gannon et al., 1991a; Fontes et al., 1991), a alteração da carga líquida da areia de positiva, em pHs abaixo de 7,0, para negativa, em pHs alcalinos (pH 8,0 ou 9,0), muda a afinidade das células pela areia, de atrativa para repulsiva, o que reduz consideravelmente a retenção das mesmas dentro do sistema poroso (Kim et al., 2008).

Assim, os efeitos do pH nas características físico-químicas da superfície celular de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 e a determinação de como essas possíveis mudanças afetam o transporte das células em sistemas porosos ou sua interação com o petróleo e, conseqüentemente, com sua mobilização, devem ser avaliados em experimentos posteriores, para melhor compreensão desses fenômenos.

4.4.5. Efeito da salinidade da suspensão de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 sobre a recuperação de petróleo em sistema poroso não-consolidado

A elevação da concentração de NaCl na suspensão de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 não proporcionou diferenças estatísticas quanto ao percentual de petróleo retido nos sistemas porosos não-consolidados ($p = 0,055$). No entanto, observou-se que o aumento da concentração de NaCl da suspensão de células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1 ($D.O_{600} = 5$) para os valores de 50 ou 100 $g L^{-1}$, resultou em menor deslocamento do óleo retido no núcleo (Figura 9). Em ausência do sal, o residual de óleo na coluna correspondeu a aproximadamente 33,0 % do petróleo total injetado, enquanto nos tratamentos com 50 e 100 $g L^{-1}$ de NaCl ocorreu uma elevação da saturação residual para 59,0 e 62,0 %, respectivamente.

Assim como relatado para o pH, um dos fenômenos que podem estar envolvidos na alteração da capacidade das células em promover a mobilização do óleo nos sistemas porosos testados é o seu transporte através deste. Gannon e colaboradores (1991b) relatam que a presença de NaCl na suspensão bacteriana pode influenciar no seu transporte através da coluna de areia. Os autores assumem que alterações de origem eletrostática tanto na superfície celular quando na matriz sólida podem ser o mecanismo chave para o retardamento do transporte das células na presença do sal. Porém, mais trabalhos devem ser realizados de modo a avaliar o efeito de um maior ou menor tempo de retenção celular dentro das colunas na sua

capacidade em mobilizar o petróleo. Além disso, não podem ser descartadas alterações de origem físico-química dos compostos presentes na superfície celular, que supostamente estariam envolvidos na recuperação do óleo.

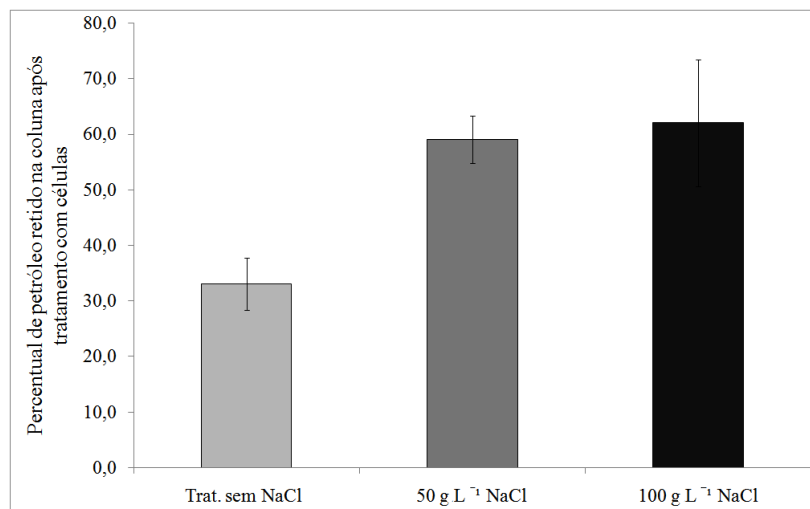


Figura 8. Percentual de petróleo retido na coluna após a adição de diferentes concentrações de NaCl à suspensão de células hidrofóbicas (MATH = 75 %) ajustadas à $DO_{600} = 5,0$ de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, crescido em TSB suplementado com 5 g L^{-1} de glicose por 72 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação a 200 rpm. Após o tratamento com 10 volumes de poro (VP) de água a coluna foi tratada com 4 volumes de poro da suspensão de células ressuspendidas em PBS pH 7,4 + 1 VP de água. O experimento foi conduzido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. O óleo residual inicial após o tratamento com a água foi em média 86,7 %. As linhas sobre as barras indicam o desvio-padrão da média de 2 repetições. Os tratamentos não foram considerados significativos pelo teste F com 5 % de probabilidade ($p = 0,055$).

5. CONCLUSÕES

Em núcleo poroso não-consolidado a injeção da suspensão de células lavadas de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, após o crescimento em meio TSB adicionado de 5 g L⁻¹ de glicose promove a recuperação de petróleo retido no núcleo em todas as concentrações testadas. Quanto maior a concentração de células na suspensão, menor o percentual de óleo retido na coluna. O que indica a presença de compostos ou constituintes celulares que auxiliam na recuperação de petróleo. O valor de pH da suspensão de células para injeção no sistema poroso saturado com o óleo residual bem como a salinidade influenciam a mobilização do óleo, fato atribuído a possíveis alterações nos compostos e/ou superfícies responsáveis pelo fenômeno. A bactéria ou o composto proveniente da mesma apresenta capacidade emulsificante e, conseqüentemente, potencial para uso em MEOR. Os bons resultados obtidos nesse primeiro trabalho reforçam a necessidade da elucidação dos mecanismos envolvidos na recuperação de petróleo por meio da utilização de células de *Acinetobacter* sp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahimou, F., M. Paquot, P. Jacques, P. Thonart, and P. G. Rouxhet. 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. J. Microbiol. Methods 45:119–126.

Aveyard, R., Binks, B.P. and Clint, J.H. 2003. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. Adv. Colloid Interface Sci. 102:503-546.

Babadagli, T. “Mature Field Development-a review”. SPE 93884, 1-20. 2005.

Bach, H., Gutnick, D. L. 2004. Potential applications of bioemulsifiers in the oil industry. In: Vazquez-Duhalt M, Quintero-Ramirez R (eds) Petroleum biotechnology developments and perspectives. Elsevier, Amsterdam, 233-281.

Bach, H., Berdichevsky, Y. and Gutnick, D. 2003. An Exocellular Protein from the Oil-Degrading Microbe *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 Enhances the Emulsifying Activity of the Polymeric Bioemulsifier Emulsan. Appl. Environ. Microbiol. 69:2608-2615.

Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. A review. Biosource Technol. 51:1-12.

Barbe, V., D. Vallenet, N. Fonknechten, A. Kreimeyer, S. Oztas, L. Labarre, S. Cruveiller, C. Robert, S. Duprat, P. Wincker, L. N. Ornston, J. Weissenbach, P. Marliere, G. N. Cohen, and C. Medigue. 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. Nucleic Acids Res. 32:5766-5779.

Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., and Rosenberg, E. 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2697-2702.

Barros, F. F. C.; Mano, M. C. R.; Bicas, J. L.; Dionisio, A.; Quadros, C. P.; Uenojo, M.; Neri, I. A. & Pastore, G. M. 2007a. Production and stability of *Bacillus subtilis* biosurfactants using cassava wastewater in a pilot scale. Abstracts /Journal of Biotechnology, 131: S172-S173.

Barros, F. F. C.; Mano, M. C. R.; Bicas, J. L.; Dionisio, A. P.; Quadros, C. P.; Uenojo, M.; Santos, R. Dos & Pastore, G. M. 2007b. Optimization of the production of a *Bacillus subtilis* biosurfactant using response surface method. Abstracts /Journal of Biotechnology, 131: S173.

Belsky, I., D. L. Gutnick, and E. Rosenberg. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids. FEBS Lett. 101:175-178.

Bergogne-Bérézin E. and Towner, K. J. 1996. *Acinetobacter* spp as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. Clin. Microbiol. Rev. 9:148-165.

Binks, B. P. 2002. Particles as surfactants – similarities and differences. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7:21–4.

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

Borges, M. T.; Nascimento, A. G.; Rocha, U. N.; Tótola, M. R. 2008. Nitrogen starvation affects bacterial adhesion to soil. Brazilian Journal of Microbiology. 39:457-463.

Busscher, H. J., B. van de Belt-Gritter, and H. C. van der Mei. 1995. Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. Colloids Surf. B 5:111–116.

Caposio, P., Pessione, E., Giuffrida, G., Conti, A., Landolfo, S., Giunta, C. and Gribaudo, G. 2002. Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. Res. Microbiol. 153: 69-74.

- Cameotra, S. S. & Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Environ Microbiol.* 50:520-529.
- Castellanos, T.; Ascencio, F.; Bashan, Y. 2000. Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Ecol.* 33:1-9.
- Chamanrokh, P., Assadi, M. M., Noohi, A., Yahyai, S. 2008. Emulsan analysis produced by locally isolated bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *Iran J. Environ. Health. Sci. Eng.* 5, 101–108.
- Cooper, D. G., J. Akit, and N. Kosaric. 1982. Surface activity of the cells and extracellular lipids of *Corynebacterium fascians* CF15. *J. Ferment. Technol.* 60:19–24.
- Cooper, D.J. & Goldenberg, B.G., 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 54:224-229.
- Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Elahi, E., Asad, S., and Banat, I. M.. 2008. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnol Lett.* 30:263–270.
- Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F. and Fani, R. 1997. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res. Microbiol.* 148:237–249.
- Dignac, M. F., Urbain, V., Rybacki, D. Bruchet A, Snidaro, D. Scribe, P. 1998. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Wat Sci Technol.* 38:45-53.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 939-951.

Dorobantu, L.S., Yeung, A.K.C., Foght, J.M. and Gray, M. R. 2004. Stabilization of oil/water emulsions by hydrophobic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 70:6333-6336.

Durmaz, B., Sanin, F. D.2001. Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of extracellular polymers in activated sludge. *Wat Sci. Technol.* 44:221-229.

EIA (Energy Information Administration) Annual Energy Outlook 2011 with Projections to 2035.

Farahbakhsha, A., Taghizadeha, M.; Yakhchalib, B.; Movagharnejada, K.; Zamanic, H. A. 2011. Production of a New Emulsifier Material for the Formation Heavy Hydrocarbon/Water Emulsion. *Int. J. Ind. Chem.* 2:86-92.

Fernandes, R. C. R. Hidrofobicidade celular e biossurfactantes como determinantes da capacidade desemulsificante de isolados bacterianos. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2011.

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

Gannon, J.; Tan, Y.; Baveye, P. and Alexander, M. (1991b) Effect of Sodium Chloride on Transport of Bacteria in a Saturated Aquifer Material. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2497-2501.

Gannon, J.T.; Manilal, V.B. and Alexander M.(1991a) Relationship between Cell Surface Properties and Transport of Bacteria through Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 190-193.

Gutnick, D.L., Rosenberg, E., Shabtai, Y., 1980. Production of alpha emulsans Document Type and Number: United States Patent 4234689.

- Hart, D.J., Vreeland, R.H. 1988. Changes in the hydrophobic-hydrophilic cell surface character of *Halomonas elongata* in response to NaCl. J. Bacteriol. 170:132-135.
- Hazen, K. C, Hazen, B. W. 1987. A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida Albicans* populations. J. Microb. Methods. 6:289-299.
- Hori, K., Watanabe, H., Ishii, S., Tanji, Y., and Unno, H. 2008. Monolayer adsorption of a bald mutant of the highly adhesive and hydrophobic bacterium, *Acinetobacter* sp. Tol 5, to a hydrocarbon surface, Appl. Environ. Microbiol. 74:2511-2517.
- Jonsson, P., Wadstrom, T. 1983. High surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* as revealed by hydrophobic interaction chromatography. Curr Microbiol. 8:347-353.
- Joshi, S.; Bharucha, C.; Jha, S.; Yadav, S.; Nerurkar, A.; Desai, A. J. 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Biores. Technol. 99:195-199.
- Kabir, M. S., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H. Tsunedomi, R., Yamada, M. 2004. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. Microbiology. 150:2543-2553.
- Kang, Z., Yeung A., Foght, J.M. and Gray, M.R. 2008. Mechanical properties of hexadecane-water interfaces adsorbed with hydrophobic bacteria. Colloids and Surfaces:Biointerfaces. 62:273-279.
- Kaplan, N., and E. Rosenberg. 1982. Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production in *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. Appl. Environ. Microbiol. 44:1335–1341.

Kaplan, N., Z. Zosim, and E. Rosenberg. 1987. *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan: reconstitution of emulsifying activity with pure polysaccharide and protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:440–446.

Khire, J. M. e Khan, M. I. 1994. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanism of MEOR. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 170 –172.

Kim, S. B.; Park, S. J.; Lee, C. G.; Choi, N. C. e Kim, D. J. 2008. Bacteria transport through goethite-coated sand: Effects of solution pH and coated sand content. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 63:236–242.

Kjelleberg, S., and M. Hermansson. 1984. Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:497-503.

Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T., Chung, S.-Y. and Kubo, M. 2001. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *J. Biosci. Bioeng.* 91:94-96.

Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., and Matosic, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 94: 981–987.

Kosaric, N., 1992. Biosurfactants in industry. *Pure Appl. Chem.* 64, 1731–1737.

Lindahl, M., Faris, A., Wadstrom, T. and Hjerten, S. 1981. A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochem Biophys Acta.* 67:471-476.

Mandal, A.; Samanta, A.; Bera, A.; and Ojha, K. 2010. Role of Oil-Water Emulsion in Enhanced Oil Recovery International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (ICCCE 2010).

McInerney, M. J.; Youssef, N.; Fincher, S.; Maudgalya, S.K.; Folmsbee, M. J.; Knapp, R. & Nagle, D. 2004. Development of Microorganisms With Improved Transport and Biosurfactant Activity for Enhanced Oil Recovery. Annual Report.

McInerney, M. J.; Nagle, D. P. & Knapp, R. M. Microbially Enhanced Oil Recovery: Past, Present, and Future. p. 215–237. In Ollivier, B. & Magot, M. (Org.). Petroleum microbiology. 365 p. ASM Press, Washington, DC, 2005.

Miorner, H., Albertsson, P. and Knorvall, G. 1982. Isoelectric points and surface hydrophobicity of gram positive cocci as determined by cross-partition and hydrophobic affinity in aqueous two-phase systems. *Infect Immun.* 36:227-234.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3240-3244.

Nitschke, M.; Ferraz, C. & Pastore, G. M. 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35:81-85.

Noyce, J. e Hughes, J. 2003. Bactericidal Effects of negative and positive ions generated in nitrogen on starved *Pseudomonas veronii*. *Journal of Electrostatics.* 57: 49-58.

Nozawa, Y.; Kasai, R.; Sekiya, T. 1980. Modification of membrane lipid composition following the nutritional shift-up of starved cells. A comparison with membrane biogenesis in Tetrahymena. *Biochimica et Biophysica Acta.* 603:347-365.

Pantophlet, R., Severin, J.A., Nemeč, A., Brade, L., Dijkshoorn, L. and Brade, H. 2002. Identification of *Acinetobacter* isolates from species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus Acinetobacter baumannii* complex with monoclonal antibodies specific for O antigens of their lipopolysaccharides. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 9:60-65.

Pines, O.; Bayer, E.A.; Gutnick, D.L. 1983. Localization of Emulsan-Like Polymers Associated with the Cell Surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 154: 893-905.

Robinson, K., M. Gosh, and Z. Shu. 1996. Mineralization enhancement of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. Water Sci. Technol. 34:303–309.

Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Legmann, R. and Ron, E. Z. 1967. Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biosurfactant. Appl Environ Microbiol, 54:323-326.

Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactants. Crit Rev Biotechnol. 3:109-132.

Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microb Lett. 9:29-33.

Rosenberg, E. and Ron, E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 52: 154-162.

Rosenberg, E., and E. Z. Ron. 1997. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. Curr. Opin. Biotechnol. 8:313-316.

Rosenberg, E., and E. Z. Ron. 1998. Surface active polymers from the genus *Acinetobacter*, p. 281–289. In D. L. Kaplan (ed.), Biopolymers from renewable resources. Springer, New York, N.Y.

Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. and Gutnick, D. L. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol. 37:402-408.

Rosenberg, M., A. Perry, E. A. Bayer, D. L. Gutnick, E. Rosenberg, and I. Ofek. 1981. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect. Immun.* 33:29-33.

Rosenberg, M.; Bayer, E. A.; Delarea J.; Rosenberg, E. 1982. Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 929-937.

Rossmann, M. Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes mm meios a base de melaço e manipueira. Dissertacao (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Vicoso, 2007.

Rudin, J. e Wasan, D. 1992. Mechanisms for lowering of interfacial tension in alkali/acidic oil systems 2. Theoretical studies. *Colloids and Surfaces.* 68:81-94.

Sar, N., e Rosenberg, E. 1983. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Curr. Microbiol.* 9:309–314.

Sanin, S. L.; Sanin, F. D. e Bryers, J. D. 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry.* 38:909-914.

Shabtai, Y. e Gutnick, L. I. L. 1985. Exocellular esterase and emulsan release from the cell surface of *Acinetobacter calcoeceticus*. *J Bacterial.* 161:1176-1181.

Singleton, D. R., Masuoka, J., and Hazen, K. C. 2001. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol* 183: 3582–3588.

Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y. and Kato, N. 2001. Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* 183:1819-5827.

Taylor, W. H., and E. Juni. 1961. Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide. I. Characterization of the organism and polysaccharide. *J. Bacteriol.* 81:688–693.

Thomas, S. Farouq Ali, S. M. 1989. Flow of emulsions in porous media, and potential for enhanced oil recovery', *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 3:121-136.

Toren, A., Ron, E.Z., Bekerman, R., and Rosenberg, E. 2002. Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AlnA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 580–584.

Van der Mei, H. C., J. de Vries, and H. J. Busscher. 1993. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4305–4312.

Van der Mei, H. C., B. van de Belt-Gritter, and H. J. Busscher. 1995. Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 2. Adhesion mechanisms. *Colloids Surf. B* 5:117-126.

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

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 53:1893-1897.

Volkering, F., A. Breure, and W. Rulkens. 1997. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8:401–417.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and Schleifer, K. 1994. Development of an rRNA targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:792-800.

Walzer, G.; Rosenberg, E.; Ron, E. Z. 2006. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environ. Microbiol.* 8:1026-1032.

Yen, T.F.1990.Microbial Enhanced Oil Recovery: Principle and Practice, CRC Press, Boca Raton, FL.

Yan, N., M. R. Gray, and J. H. Masliyah. 2001. On water-in-oil emulsions stabilized by fine solids. *Colloids Surfaces A* 193:97–107.

Youssef, N.; Simpson, D. R.; Duncan, K. E.; McInerney, M. J.; Folmsbee, M.; Fincher, T. and Knapp, R. M. 2007.In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir.*Appl. Environ. Microbiol.* 73:1239-1247.

Zosim, Z., G. Fleminger, D. L. Gutnick, and E. Rosenberg. 1989. Effect of protein on the emulsifying activity of emulsan. *J. Dispersion Sci. Technol.* 10:307–317.