

FABIANE DE MESQUITA BATISTA

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis* COM ELEVADA
EFICIÊNCIA NA MOBILIZAÇÃO DE ÓLEO PESADO

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
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FABIANE DE MESQUITA BATISTA

PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis* COM ELEVADA
EFICIÊNCIA NA MOBILIZAÇÃO DE ÓLEO PESADO

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: 12 de Setembro de 2008.

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Co-orientador)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Prof. Célia Alencar de Moraes

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Co-orientador)

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

Dedico aos meus pais,
Antonio e Sulamita, e aos
meus irmãos, Fábio e
Cristiane, que são o
alicerce da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade em realizar o Mestrado e por possibilitarem meu amadurecimento profissional e pessoal.

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

Ao Prof. Marcos Rogério Tótola pela orientação, paciência e ensinamentos.

À Cássia, pela ajuda durante os experimentos.

Aos professores Antônio Galvão do Nascimento e Luis Henrique Mendes da Silva, pelos ensinamentos e incentivos.

Aos demais professores e técnicos do Departamento de Microbiologia.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), minha segunda casa na época dos experimentos, e aos colegas com quem nele convivi e trabalhei.

À FINEP e à PETROBRAS, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, que lutaram arduamente, proporcionando a mim e aos meus irmãos condições para que pudéssemos alcançar os nossos objetivos. São os grandes responsáveis pela pessoa que sou e por tudo que conquistei. AMO VOCÊS.

À Vinícius Fialho Reis, pelo amor, companheirismo, pelas palavras de conforto e incentivo, e por me agüentar nos dias de cansaço e mau humor. À sua família e à sua mãe, Carmem Fialho, que foi uma grande amiga.

À amiga Maike Rossmann, com quem compartilhei tempo, experiências, angústias e alegrias, e que me permitiu conhecer seu fiel escudeiro, Paulo Ricardo, amparando-me com sua experiência em estatística.

Ao meu amigo Péricles Fernandes pela paciência, dedicação e ajuda nas infindáveis curvas de crescimento, juntamente com minha estagiária Marcela Reis.

Às amigas Iva, Rejane, Michele, Rose Ferraz, Rosemary Tomaz e Andréia Arantes, pelos momentos de alegria.

À Edna Lopes Hardoim, com quem comecei a me apaixonar pela Microbiologia. Uma profissional competente, uma mulher linda e uma grande amiga.

A todas as pessoas, às que mencionei e àquelas a quem não mencionei, que passaram pela minha vida durante esses dois anos em Viçosa, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 EOR	4
2.2 MEOR	5
2.3 FATORES LIMITANTES DA PRODUÇÃO DE PETRÓLEO	6
2.4 BIOSSURFACTANTES	8
2.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR <i>Bacillus subtilis</i> E A UTILIZAÇÃO NA MEOR	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 ISOLADOS BACTERIANOS	14
3.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO SALINA NO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS E NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	14
3.2.1 Meio de cultivo	14
3.2.2 Preparo dos inóculos e condições de cultivo	16
3.2.3 Produção de biossurfactantes	17
3.2.4 Avaliação da produção de biossurfactantes	17
3.2.5 Desenho experimental, análise de superfície de resposta e determinação das condições ótimas para produção de biossurfactantes em anaerobiose	18
3.3 AVALIAÇÃO DE MOBILIZAÇÃO DE ÓLEO PESADO EM NÚCLEOS POROSOS E AREIA PELA AÇÃO DE EXTRATOS DE BIOSSURFACTANTES	20
3.3.1 Meio de cultura, preparo dos inóculos e condições de cultivo	20
3.3.2 Avaliação da produção de biossurfactante	20

3.3.3 Montagem de núcleos porosos de areia	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO SALINA NO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS E NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	24
4.2 AVALIAÇÃO DE MOBILIZAÇÃO DE ÓLEO PESADO EM NÚCLEOS POROSOS E AREIA PELA AÇÃO DE EXTRATOS DE BIOSSURFACTANTES	34
4.2.1 Caracterização dos Extratos de Biossurfactante	34
4.2.2 Estudo da Recuperação de Óleo Pesado em Núcleos Porosos de Areia	37
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

A larga utilização do petróleo no processo de industrialização do século XX facilitou o desenvolvimento humano em diversos campos, mas levou a uma grande preocupação na entrada do século XXI, qual seja: a dependência de uma fonte energética não-renovável e com reservas em suposto declínio definitivo.

Os preços dessa fonte energética influenciam as atividades macroeconômicas, uma vez que a energia gerada é utilizada direta e indiretamente na produção de bens e serviços. Além disso, a descoberta e a utilização do petróleo proporcionaram maior conforto, longevidade e riqueza à sociedade, tornando-o hoje um produto indispensável à vida moderna (Hall et al., 2003).

Dada a sua natureza não-renovável e ao suposto declínio das reservas mundiais de petróleo, é recorrente a discussão acerca da viabilidade dessa “commodity” como fonte de energia. Essas afirmações são freqüentemente acompanhadas da constatação de que o avanço do desenvolvimento de fontes alternativas de energia ainda mostra-se insuficiente para suprir as necessidades atuais do mundo industrializado (Hall et al., 2003).

O principal componente que ainda pesa em favor do petróleo é a sua “eficiência energética”, ou seja, sua capacidade de gerar grandes quantidades de energia em proporção à energia investida para sua produção. Esta idéia é expressa no conceito “energy returned on energy invested - EROI” (Cleveland et al., 1984). Assim, além dos custos para produção de uma determinada quantidade de energia a partir de uma determinada fonte, é importante determinar se essa fonte é viável em termos de saldo energético. Ainda são raras as fontes alternativas que apresentam elevados valores de EROI (Hall et al., 2003).

Neste ponto, cabe ressaltar a incerteza dos estudos que tentam prever o nível das reservas mundiais de petróleo – todo o petróleo que poderia ser recuperado, ainda que sem levar em consideração como – e a possível taxa de utilização dessas reservas durante os próximos anos. Além dos fatores políticos e econômicos, o desenvolvimento de novas tecnologias de extração do petróleo e a expansão das fontes alternativas tornam especialmente difícil precisar a taxa com que essas reservas serão utilizadas nos próximos anos. Portanto, é ainda temerário afirmar a longevidade da era do petróleo e prever quando a escassez do produto afetará de fato o desenvolvimento mundial (Hall et al., 2003).

Diante do exposto, pode-se afirmar que novas pesquisas que objetivem melhorar a recuperação do petróleo dos reservatórios atualmente em exploração, não se encontram na contramão de uma suposta melhora da estratégia energética mundial, representada pelo desenvolvimento de fontes energéticas “limpas” e renováveis. Pelo contrário, são instrumentos necessários para que o petróleo seja produzido em bases econômicas e de forma ecologicamente satisfatória, através da diminuição dos custos financeiros e energéticos de sua extração. Outro fator a ser considerado diz respeito à qualidade do óleo em um reservatório. Um dos grandes desafios no desenvolvimento de tecnologia de exploração é aumentar a capacidade de recuperação dos reservatórios de óleo pesado. Esse tipo de óleo, que representa mais da metade das reservas mundiais, é definido como o que apresenta viscosidade entre 100 e 10.000 cP na temperatura de reservatório e uma densidade entre 10° e 20° API (Bannwart et al., 2006).

Com a necessidade de melhorar o aproveitamento dos reservatórios – tendo em vista os níveis relativamente baixos de eficiência das técnicas tradicionais– tem-se ampliado as pesquisas para o desenvolvimento de novas técnicas de recuperação. Essas técnicas são baseadas em processos de recuperação avançada de petróleo (Enhanced Oil Recovery – EOR) (McInerney et al., 2005). Dentre elas, destaca-se a recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos (Microbially enhanced oil recovery – MEOR), que tem sido apontada como uma das técnicas mais promissoras para recuperação do petróleo (Youssef et al., 2007a; McInerney et al., 2005).

A MEOR consiste no emprego dos próprios microrganismos ou de metabólitos microbianos, como os biossurfactantes. A aplicação de biossurfactantes na MEOR permite a obtenção de tensões interfaciais (TIF) ultra-baixas e, desta forma, um incremento na remoção do óleo contido em um reservatório (McInerney et al., 2003b; Youssef et al., 2007b). Normalmente, esse efeito é alcançado quando a concentração dos biossurfactantes encontra-se acima da Concentração Micelar Crítica (CMC), a qual corresponde à concentração em que os monômeros de biossurfactantes passam a se organizar em micelas. Os biossurfactantes são produzidos por um elevado número de espécies microbianas e apresentam uma diversidade de estruturas químicas (Banat, 1995; Singh et al., 2007; Sen, 2008.). Misturas de moléculas distintas de biossurfactantes podem apresentar estruturas micelares mais estáveis e, com isso, uma maior eficiência na remoção de óleo (Razafindralambo et al., 1997).

Bacillus subtilis produz um biossurfactante lipopeptídico conhecido como surfactina, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72,3 para 27 mN m⁻¹ e a tensão interfacial óleo-água de injeção para valores abaixo de 0,01 mN m⁻¹, com CMC variando entre 25 e 180 mg L⁻¹ (Cooper,1981; Lin et al., 1994; Morikawa et al., 2000; Barros et al., 2007a; Lima, 2008).

Nesse trabalho, foi testada a hipótese de que os biossurfactantes produzidos por isolados de *Bacillus subtilis* pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA/DMB/UFV), em condição anaeróbia, são capazes de mobilizar óleo pesado em sistemas porosos de areia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EOR

As técnicas de extração do petróleo são baseadas, principalmente, na recuperação primária e secundária do óleo. A recuperação primária consiste na extração natural do petróleo por diferença entre a pressão interna e externa do reservatório. A partir do momento em que há uma queda na pressão interna e o conseqüente declínio do volume de óleo explotado, passa-se a adotar as técnicas de recuperação secundária, as quais se baseiam na injeção de gás ou água para aumentar a pressão interna e, assim, a extração do óleo (Bryant, 1991). A aplicação dessas duas técnicas permite a recuperação de apenas 33% a 50% do petróleo originalmente presente no reservatório (Youssef et al., 2007a).

Os mecanismos de recuperação avançada de petróleo (Enhanced Oil Recovery – EOR) compreendem quatro principais processos, que se baseiam em soluções diferentes para reproduzir um mesmo resultado, o aumento da mobilização do óleo, a saber: i) **Térmicos**, que incluem a combustão *in situ* e injeção de vapores para reduzir a viscosidade do petróleo; ii) **Miscibilidade**, como a injeção de gases miscíveis (CO₂, gás natural e N₂), também com o objetivo de reduzir a viscosidade do óleo; iii) **Químicos**, como a adição de surfactantes e co-surfactantes, emulsificantes e polímeros e iv) **Microbiológicos**, por meio do emprego dos próprios microrganismos ou de metabólitos microbianos como os biosurfactantes, que reduzem a tensão interfacial do sistema rocha-óleo-água de injeção (McInerney et al., 2005; Sen, 2008).

Os dois primeiros métodos são os mais utilizados nos Estados Unidos, representando praticamente a totalidade da produção de petróleo através dos processos de EOR naquele país (Doe, 2007). Assim, através da redução da tensão interfacial (TIF) do sistema rocha-óleo-água de injeção ou da redução da viscosidade do óleo, esses processos permitem maior mobilização do petróleo dentro dos reservatórios, aumentando a produção. Segundo pesquisas realizadas em seis bases petrolíferas nos Estados Unidos, o processo de CO₂-EOR dobrou os recursos tecnicamente recuperáveis nestes reservatórios (Doe, 2007).

Ainda que promissora, a recuperação de óleo por EOR representa menos de 10% do total de petróleo extraído nos Estados Unidos, o que em grande parte é devido ao fato de que esses processos apresentam algumas desvantagens, como complexidade das

técnicas, heterogeneidade dos reservatórios e altos custos operacionais (processos químicos) ou elevada utilização de fontes de energia (processos térmicos), que os tornam ainda pouco viáveis economicamente (Morgan et al., 1979 apud Liu et al., 2004; McInerney et al., 2004a; McInerney et al., 2005; Youssef et al., 2007a; Doe, 2007).

2.2 MEOR

Potencialmente utilizável em reservatórios considerados como de baixo nível de petróleo ou mesmo “esgotados” – face à dificuldade de aplicação de outras técnicas para recuperar o óleo residual – a recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos (Microbially Enhanced Oil Recovery – MEOR) tem sido apontada como uma das técnicas mais promissoras para a otimização do aproveitamento das reservas de petróleo, com consideráveis possibilidades de aplicação em larga escala (Doe, 2007; McInerney et al., 2004b; Youssef et al., 2007a).

As vantagens da MEOR são devidas ao fato de que esse processo não consome grandes quantidades de energia, como o processo térmico, e é independente do preço do petróleo cru, ao contrário de muitos processos químicos. Existe ainda a possibilidade de obtenção de produtos microbianos com a utilização de fontes renováveis e de baixo custo (Cameotra & Makkar, 1998; Nitschke et al., 2004; 2006; Barros et al., 2007b; Barros et al., 2007c; Rossmann, 2008).

A MEOR consiste no emprego dos próprios microrganismos ou de metabólitos microbianos, como os biossurfactantes, para se obter diversos efeitos que aumentem a recuperação do petróleo. Dentre os efeitos que podem ser alcançados com esse processo, merecem destaque: i) **a formação de gases** (ex.: CO₂ e CH₄), com conseqüente aumento da pressão interna do reservatório e redução da viscosidade do óleo; ii) **produção de ácidos** (ex.: acético, butírico e láctico), que propicia a degradação da matriz de calcário, aumentando a liberação do óleo residual; iii) **produção de solventes** (ex.: etanol, butanol e acetona), os quais propiciam redução na viscosidade do óleo; iv) **produção de polímeros** (ex.: polissacarídeos, proteínas), que aumentam a viscosidade da água de injeção ; v) **produção de bioemulsificantes** (ex.: heteropolissacarídeos, proteínas), os quais promovem a emulsificação do óleo; vi) **produção de biossurfactantes** (ex.: glicolípídeos e

lipopeptídeos), que reduzem a tensão interfacial óleo-rocha e óleo-água de injeção¹; vii) **formação de biomassa microbiana**, que promove um bloqueio seletivo nas zonas de alta permeabilidade (McInerney et al., 2005; Banat, 1995).

Economicamente viável (Youssef et al., 2007a) e de aplicabilidade considerável², essa tecnologia ainda não é amplamente empregada em razão da inconsistência do desempenho técnico e da falta de medidas que quantifiquem a capacidade microbiana ou os produtos microbianos, como por exemplo concentração de biossurfactante, requeridos para mobilizar o petróleo de um dado reservatório.

A utilização de microrganismos na recuperação de petróleo é especialmente explorada neste trabalho em relação a dois aspectos, quais sejam: a possibilidade da produção de biossurfactantes por isolados de *Bacillus subtilis* em condições similares às encontradas em reservatórios de óleo e a capacidade de remoção de óleo pesado contido em sistemas porosos de areia por esses biossurfactantes, “sozinhos” ou em misturas.

2.3 FATORES LIMITANTES DA PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

Uma vez determinados os fatores limitantes da produção de petróleo, pode-se decidir qual processo microbiano pode ser utilizado para aumentar a eficiência de exploração. Processos microbianos genéricos não serão bem sucedidos, visto que as propriedades físico-químicas do reservatório e fatores que influenciam a retenção do óleo são altamente variáveis (McInerney et al., 2005). Porosidade, molhabilidade, permeabilidade, saturação e pressão capilar são algumas propriedades da rocha-reservatório que podem reter óleo, destacando-se dentre elas a porosidade, a permeabilidade e a saturação.

A rocha reservatório funciona como uma esponja, ora estocando, ora expulsando petróleo. A capacidade de estocagem é dependente da porosidade, que é dada pelo somatório de volumes “vazios” na rocha dividido pelo volume total dessa mesma rocha

¹ Tensões interfaciais ultra-baixas de óleo-água de injeção têm sido obtidas com a utilização de surfactantes sintéticos – sintetizados quimicamente – ou biológicos – sintetizados por microrganismos (biossurfactantes) (McInerney et. al., 2004a).

² Segundo o National Institute for Petroleum & Energy Research (EUA), 27% dos reservatórios de petróleo daquele país são adequados para utilização da MEOR (Bryant, 1991).

(expressa em porcentagem). Uma porosidade útil funciona como uma rede de comunicação entre os poros da rocha, permitindo o deslocamento do petróleo (Planckaert, 2005).

A permeabilidade é a habilidade da rocha em permitir a circulação do petróleo. A quantidade total de óleo originalmente retido num reservatório de petróleo depende da porosidade e da saturação. A saturação do petróleo é igual ao volume de petróleo por unidade de volume poroso (expressa em porcentagem) e nunca será de 100%, dada a presença de água no volume poroso.

Dentre os fatores que diminuem ou dificultam a recuperação do óleo, podem ser mencionados: i) baixa permeabilidade de alguns reservatórios de petróleo; ii) alta viscosidade do óleo e iii) alta tensão interfacial entre o sistema rocha-óleo-água, que resulta no aumento da força capilar e impede a remoção do petróleo contido no reservatório (Banat, 1995; McInerney et al., 2005).

A recuperação de petróleo é influenciada por uma força física chamada número capilar (N_{ca}), que pode reter ou expulsar o petróleo, e é dada pela fórmula (McInerney et al., 2005; Sen, 2008):

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

sendo: μ = viscosidade da fase aquosa;

v = velocidade do fluido;

γ = tensão interfacial óleo/fase aquosa.

Uma recuperação significativa de óleo depende de um incremento no valor do N_{ca} , obtido por meio da utilização de biossurfactante, que reduz a tensão interfacial e, conseqüentemente, permite maior recuperação de óleo (McInerney et al., 2004a; McInerney et al., 2005). Estimativas sugerem que uma redução da tensão interfacial de três ordens de magnitude é necessária para uma recuperação substancial de óleo (Reed and Healy, 1977 **apud** McInerney et al., 2005).

2.4 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são produzidos naturalmente pelos microrganismos a partir de vários substratos, incluindo açúcares, óleos e resíduos orgânicos diversos. Esses compostos estão relacionados a diferentes aspectos do funcionamento celular, a exemplo da promoção da motilidade, sinalização e diferenciação celular; emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água, aderência ou liberação da célula de superfícies, formação de biofilmes e atividade antibiótica (Lin, 1996; Morikawa et al., 2000; Nitschke et al., 2002; Kearns et al., 2003; Singh et al., 2007; Sen, 2008).

Tanto os surfactantes sintéticos quanto os biossurfactantes podem ser utilizados na recuperação avançada de petróleo, desde que sejam capazes de propiciar: i) o aumento da molhabilidade, permitindo maior contato com a superfície da rocha e o biossurfactante; ii) o aumento da interação célula microbiana-óleo e iii) a redução da tensão interfacial (TIF) do sistema rocha-óleo-água de injeção, com conseqüente aumento da remoção do petróleo para a fase líquida (água de injeção), afastando-o da superfície, ou a formação de espuma (Figura 1).

O emprego de surfactantes sintéticos na EOR apresenta algumas desvantagens em relação à utilização de biossurfactantes, a saber: i) são necessárias altas concentrações de surfactantes sintéticos para se reduzir a TIF; ii) esses compostos são sintetizados a partir de derivados de petróleo cru, acompanhando a variação de seu preço; iii) são menos biodegradáveis que os biossurfactantes e iv) podem causar danos ao ambiente, em razão de sua toxicidade (Durham, 1961 apud Shaw, 1975; Banat, 1995; Banat et al., 2000; McInerney et al., 2004a; Singh et al., 2007; Sen, 2008).

Sinteticamente, o interesse pela utilização de biossurfactantes frente a outras técnicas de EOR deve-se a características como: i) baixa toxicidade; ii) biodegradabilidade; iii) diversidade química, com ampla faixa de comportamento termodinâmico (o que permite aplicações específicas como a obtenção de biossurfactantes com características desejáveis segundo a composição do óleo de interesse) e iv) viabilidade econômica, pois são efetivos na recuperação do óleo mesmo em baixas concentrações (Banat, 1995; Banat et al., 2000; McInerney et al., 2004 a).

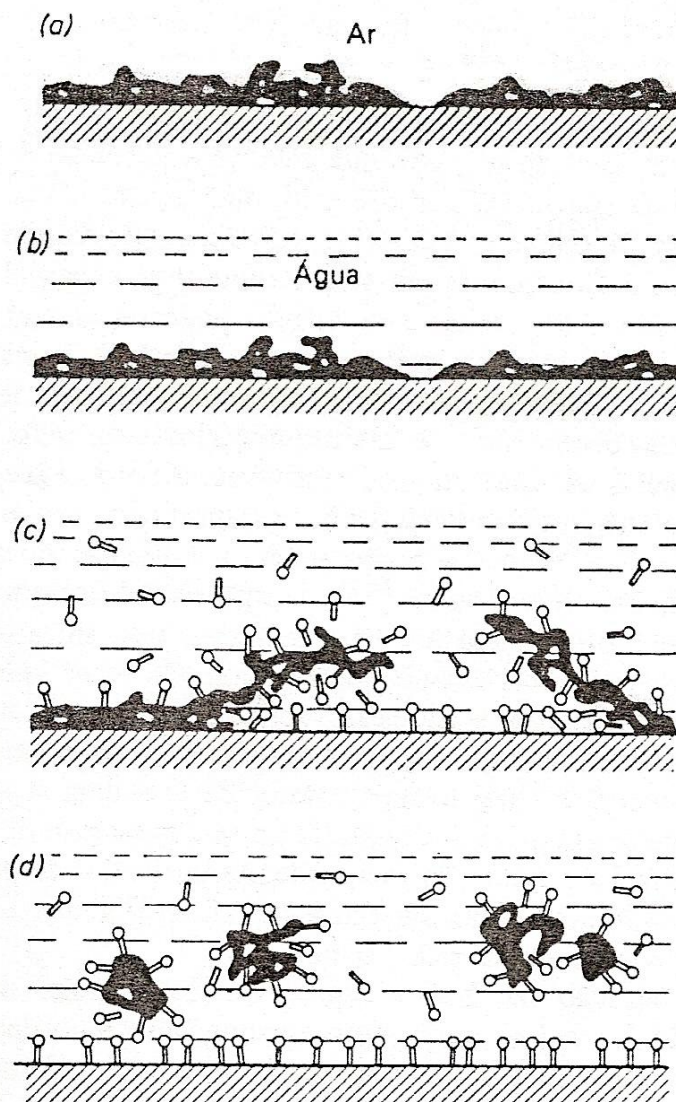


Figura 1 – Remoção de petróleo de uma superfície pela ação de surfactante sintético ou biosurfactante e ação mecânica. **(a)** Superfície coberta por petróleo; **(b)** Alta tensão interfacial óleo-água de injeção dificulta a remoção; **(c)** Adição de (bio) surfactante à água de injeção, que promove a redução da tensão interfacial do sistema rocha-óleo-água de injeção, diminuindo a adesão superfície-petróleo; **(d)** manutenção do óleo em suspensão no interior das micelas de (bio) surfactante, enquanto os monômeros ficam adsorvidos à superfície, formando uma barreira e evitando que o petróleo seja novamente depositado na superfície (Kushner, L. M. e Hoffman, J.I., 1951 apud Shaw, 1975).

Dentre as principais classes de biossurfactantes, citam-se os glicolipídios, os fosfolipídios, os lipídios neutros, os ácidos graxos, os lipopolissacarídeos, os lipopeptídios e lipoproteínas, os surfactantes poliméricos e os surfactantes particulados. Esta classificação é dada de acordo com a composição química do biossurfactante e sua origem microbiana. Em geral, a estrutura química dessas substâncias é formada por uma molécula anfifílica, consistindo de um domínio hidrofílico (polar) e um domínio hidrofóbico (apolar). O domínio hidrofílico pode ser iônico (aniônico ou catiônico), não-iônico ou anfotérico, e o domínio hidrofóbico é geralmente composto de uma cadeia de hidrocarboneto (Banat, 1995; Desai & Banat, 1997).

Fatores como fonte de carbono, concentração de N, P, Mg, Fe e Mn, assim como condições específicas de crescimento do microrganismo, influenciam o tipo, a qualidade e a quantidade de biossurfactante produzido (Banat, 1995).

Segundo Banat (1995), são conhecidas três formas de utilização de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos, quais sejam: i) injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e crescimento *in situ*; ii) injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento da microbiota indígena produtora de biossurfactante; iii) produção de biossurfactantes em reatores (*ex situ*) e posterior injeção no reservatório.

Características dos reservatórios, tais como ausência de oxigênio, estrutura geológica (porosidade e permeabilidade) e condições extremas de temperatura (40 – 70 °C), de salinidade (2–10%), pH (4–8) e de pressão (6,5-21 kPa) devem ser consideradas para escolha da melhor estratégia de MEOR, bem como do microrganismo a ser aplicado. Na MEOR, o microrganismo selecionado deve ser capaz de produzir biossurfactante e de crescer em anaerobiose, nas condições extremas de temperatura, salinidade e pressão citadas acima (Yakimov et al., 1997; Banat, 1995).

2.5 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis* E SUA UTILIZAÇÃO NA MEOR

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos, anaeróbia facultativa (NAKANO et al., 1997, 1998) e com eficiência comprovada na produção de biosurfactante tanto em aerobiose quanto em anaerobiose (Batista et al., 2006; Fernandes, 2007; Lima, 2008; Rossmann, 2008), e na remoção de petróleo (Makkar & Cameotra, 1997, 1998; Nazina et al., 2003; Youssef et al., 2007a).

B. subtilis foi anteriormente descrita como uma espécie aeróbia estrita, mas estudos recentes têm demonstrado que esse microrganismo é capaz de crescer em anaerobiose, seja pela utilização de nitrato ou nitrito como acceptor final de elétrons ou por fermentação na ausência desses aceptores (Nakano et al., 1997; 1998; 2002).

A fermentação de *B. subtilis* é muito ineficiente quando comparada à de *Escherichia coli*, e tem sua via estimulada pela presença de piruvato. Outra característica da fermentação de *B. subtilis* é a produção de produtos finais como etanol, lactato, acetoína e 2,3-butanodiol (Cruz et al., 2000). O 2,3-butanodiol é um co-surfactante natural que aumenta a tolerância dos biosurfactantes à salinidade (Maudgalya, 2005).

Ao contrário de *E. coli* que usa uma variedade de aceptores finais de elétrons, *B. subtilis* utiliza apenas nitrato ou nitrito. A redução de nitrato, mas não a de nitrito, é acoplada à geração de APT através de uma força próton motora. Durante a respiração de nitrato, esse é reduzido a amônio via nitrito, com produção de gases como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) ou nitrogênio (N₂).

Bacillus subtilis produz diferentes biosurfactantes conhecidos como surfactina, iturina e fengicina. O primeiro apresenta habilidade de reduzir a tensão superficial da água para valores próximos a 27 mN m⁻¹ e tensão interfacial óleo-água de injeção para valores abaixo de 0,01 mN m⁻¹, com concentração micelar crítica (CMC) variando entre 25-180 mg L⁻¹ (Cooper, 1981; Lin et al., 1994; Morikawa et al, 2000; Barros, 2007a; Lima, 2008). Os demais têm sido reportados como possuindo atividade anti-fúngica (McInerney et al., 2004b; Mulligan, 2005).

Os biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* possuem estrutura química similar, porém há evidências de diferenças quanto aos seus aminoácidos e ácidos graxos

(McInerney et al., 2004b). Pequenas variações na estrutura química afetam a atividade desses compostos (Morikawa et al., 2000).

Neste trabalho, destaca-se a ação da surfactina, em razão do seu potencial em reduzir a tensão superficial e interfacial (Cooper et al., 1981; Lin 1996; Sen et al., 1997). Sua molécula é composta de um heptapeptídeo cíclico (Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-D-Leu-Leu) ligado a uma molécula de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta pode variar de 13-15 átomos de carbono (Sullivan, 1998; Barros et al., 2007a). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3 hidróxi-13-metil-tetradecanóico ligado por ligação lactona, tal como os demais (Barros et al., 2007a.).

Segundo Sullivan (1998), os genes que regulam a produção de surfactina são regulados por dois sistemas de *quorum sensing*, sendo que um deles possui habilidade para monitorar a densidade celular. Assim, a produção de surfactina é diretamente proporcional à densidade celular, sendo a produção ótima alcançada após a fase *log*.

Yakimov e colaboradores (1997), estudando o potencial de isolados de *Bacillus licheniformis* para MEOR, reportaram que em anaerobiose esses microrganismos possuem características desejáveis para aplicação em reservatório, como produção de biosurfactante em anaerobiose, em meio com alta salinidade (70 g L^{-1}) e sob alta temperatura ($50 \text{ }^\circ\text{C}$). O biosurfactante produzido por esses microrganismos, em aerobiose ou anaerobiose, foi identificado como um lipopetídeo similar à surfactina. Em anaerobiose, a produção de biosurfactante foi três vezes menor que em culturas aeróbias.

Em outros estudos, Sepahy (2005) observou que *Bacillus* spp., isolados de amostra de petróleo e água de injeção, não variaram a taxa de crescimento até $50 \text{ }^\circ\text{C}$, mas acima dessa temperatura a taxa de crescimento influenciada negativamente. Ohno (1995) também relatou o decréscimo da densidade celular de *Bacillus subtilis* com o aumento da temperatura - em experimentos de fermentação em estado sólido - e que a concentração de surfactina foi proporcional ao número final de células viáveis. O autor descreve ainda a influência da temperatura na produção de surfactina - com faixa ótima entre $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ - e no tamanho da cadeia de ácidos graxos da molécula de Iturina, fato também reportado por Kaneda (1991) para linhagens de *Bacillus subtilis*. A Iturina é um biosurfactante em cuja síntese o microrganismo utiliza ácidos graxos da membrana celular (Ohno, 1995). A composição de ácidos graxos da membrana celular é alterada pela variação na temperatura de crescimento para manutenção das propriedades celulares

(White, 2000), sendo essa variação refletida na variação dos ácidos graxos que irão compor a molécula do biossurfactante.

Makkar & Cameotra (1997; 1998) observaram que linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de biossurfactante foram capazes de crescer em altas concentrações de NaCl (4%) e ampla faixa de pH (4,5-10,5), e que os biossurfactantes produzidos nessas condições propiciaram a recuperação de 56 % a 62% do óleo (> 31 °API) contido em núcleos porosos de areia. A pesquisa demonstrou que *Bacillus subtilis* é, em princípio, uma espécie apta à utilização em MEOR. Youssef (2007a), utilizando linhagens de *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, comprovou a eficiência em condição de campo.

McInerney et al. (2004b) avaliaram diferentes combinações de biossurfactantes, com o objetivo de reduzir a tensão interfacial óleo–fase aquosa e visando a uma possível aplicação na MEOR. Os resultados mostraram que 14 das 23 combinações foram capazes de reduzir a tensão interfacial (TIF) óleo-solução aquosa de biossurfactante, provavelmente em razão da formação de uma estrutura micelar mais efetiva na mobilização do óleo do que a estrutura observada para o biossurfactante isolado, fato já amplamente demonstrado para surfactantes sintéticos (Akbas et al., 2000; Sabatini et al., 2000; Szymczyk et al., 2005).

A formação de micelas ocorre quando a concentração de biossurfactante excede a concentração micelar crítica (CMC), condição em que os monômeros de biossurfactantes, associados entre si, formam as micelas, as quais apresentam uma configuração que assegura a manutenção da porção hidrofóbica no seu interior. Quando em contato com as micelas, o petróleo tem suas moléculas fracionadas e inseridas no interior hidrofóbico, num processo conhecido como solubilização (Figura 1).

Misturas de biossurfactantes produzidas pelo mesmo microrganismo ou por microrganismos distintos (Razafindralambo, 1997) permitem a formação de estruturas micelares mais compactas ou com maior eficiência de mobilização do óleo, quando uma ou todas as características abaixo são descritas: i) redução das cargas de repulsão eletrostática ou de interações hidrofóbicas prejudiciais; ii) redução da quantidade de monômeros requeridos para formação da micela; ou iii) aumento do diâmetro do núcleo micelar (Fuangswasdi et al., 2006; McInerney et al., 2004b; Youssef 2007b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Os estudos foram conduzidos com os isolados de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258, pertencentes à coleção de culturas de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio ambiente (LBBMA). O isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 155 foi obtido por meio de cultura de enriquecimento de amostra de sedimento de mangue contaminado com petróleo, proveniente da REDUC - Refinaria Duque de Caxias, Duque de Caxias, Rio de Janeiro. *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foi obtido por meio de cultura de enriquecimento de amostra de água de produção. Esses isolados têm sido objeto de estudos pela equipe, especialmente quanto ao seu potencial em produzir biossurfactantes tanto em aerobiose quanto em anaerobiose (Batista et al., 2006; Fernandes, 2007; Lima, 2008; Rossmann, 2008).

Bacillus subtilis LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram avaliados quanto ao crescimento e produção de biossurfactante em resposta a variações de temperatura e salinidade. Posteriormente, os biossurfactantes produzidos por esses isolados foram avaliados quanto à capacidade de mobilização de óleo pesado retido em núcleos porosos de areia.

3.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO SALINA NO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS E NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

3.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura básico utilizado no estudo foi o meio mineral (MM) (Tabelas 1 e 2) descrito por Fernandes (2007). As fontes de carbono utilizadas foram sacarose a 30 g L⁻¹ e glicose a 30 g L⁻¹ para o crescimento de *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258, respectivamente. A fonte e a concentração de nitrogênio variaram de acordo com as fases do experimento (Tabela 3).

Soluções de MgSO₄, FeSO₄.7H₂O, glicose e sacarose foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao meio antes da inoculação. Os níveis de NaCl variaram de acordo com o desenho experimental (Tabela 4).

Tabela 1 - Composição do meio mineral (MM) utilizado nos experimentos de produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	13,9
KH ₂ PO ₄	2,7
Extrato de Levedura	1
NaNO ₃	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
Solução de Metais *	10 mL
pH	6,8

Fonte: Fernandes (2007).

* Tabela 2

Tabela 2 - Composição da solução de metais utilizada na suplementação do MM utilizado nos experimentos de produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258

* Solução de Metais	
Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
EDTA	1
MnSO ₄ .H ₂ O	3
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₄	0,01

Fonte: Folmsbee et al. (2004).

Tabela 3 - Fontes de nitrogênio empregadas na suplementação do MM utilizado nas diferentes fases do experimento de produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258

Fase	Fonte de Nitrogênio	
	Tipo	Concentração (g L ⁻¹)
Reativação	(NH ₄) ₂ SO ₄	1
Obtenção do inóculo	Proteose Peptona	30
Produção	Proteose Peptona	3

3.2.2 Preparo dos inóculos e condições de cultivo

Estoques de *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram reativados em MM e inoculados em 30 mL do mesmo meio contendo NaCl nas concentrações descritas na Tabela 5. As células foram incubadas por 14 - 20 h a 30 °C e 200 rpm.

Para obtenção dos inóculos adaptados à anaerobiose, as células foram centrifugadas a 10.800 g por 15 min a 4 °C (Jouan[®] MR-23i), lavadas em solução salina aeróbia, homogeneizadas e centrifugadas novamente a 10.800 g por mais 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram introduzidas em câmara anaeróbia (Anaerobic System, modelo 1025, Thermo Forma, USA), lavadas em solução salina anaeróbia, homogeneizadas e inoculadas em 45 mL do MM anaeróbio contendo NaCl (Tabela 5). O volume da suspensão de células adicionado ao meio foi o suficiente para se obter uma densidade óptica inicial (DO_{600nm}) de 0,1. As culturas foram mantidas em frascos de penicilina de 50 mL lacrados com tampa de borracha e lacres de alumínio, por 18 a 24 h e 200 rpm.

A adaptação dos inóculos às temperaturas determinadas pelo desenho experimental (Tabelas 4 e 5) ocorreu de forma gradativa. Numa primeira adaptação, o inóculo utilizado no ensaio 5 (Tabela 5) foi incubado a 30 °C e os demais a 34 °C.

As células obtidas na fase anterior foram inoculadas em MM anaeróbio contendo NaCl (Tabela 5) com o auxílio de seringas de 3 mL. Nessa segunda fase de adaptação do inóculo à anaerobiose, o tempo de incubação variou de 12 a 18 h e as temperaturas de

incubação foram de 30 °C (inóculo utilizado no ensaio 5), 34 °C (inóculo utilizado nos ensaios 1 e 3) e 45 °C (inóculo utilizado nos demais ensaios) (Tabela 5).

3.2.3 Produção de biossurfactantes

As culturas adaptadas à anaerobiose e às diferentes temperaturas e salinidades foram utilizadas para inocular 30 mL do MM anaeróbio. Os níveis de NaCl variaram de acordo com o desenho experimental (Tabela 4). Os tratamentos foram montados em frascos tipo penicilina de 50 mL, lacrados com tampa de borracha e lacres de alumínio. As culturas foram incubadas por 18 a 24 h a 200 rpm, nas temperaturas determinadas no desenho experimental (Tabela 4). O crescimento microbiano foi avaliado por meio de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) até o início da fase estacionária de crescimento.

Todas as soluções-estoque, bem como os meios de cultura, foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min e, na seqüência, desoxigenados por repetidas sessões de evacuação e repressurização com 100 % de N₂. A manipulação das células foi realizada em câmara anaeróbia (Anaerobic System, modelo 1025, Thermo Forma, USA), sob atmosfera de 5 % de CO₂, 10 % de H₂ e 85 % de N₂.

Após o crescimento das culturas, as células foram removidas por centrifugação a 8.700 g (Sorvall[®] - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 30 min, em temperatura ambiente e o sobrenadante (livre de células) contendo biossurfactantes foi considerado o extrato de biossurfactantes (EB).

3.2.4 Avaliação da produção de biossurfactante

A tensão superficial dos extratos de biossurfactantes (EB) e das diluições do EB foi avaliada utilizando-se um tensiômetro (Fisher Scientific, modelo 21, Pittsburgh, PA), à temperatura ambiente, pela técnica do anel de Du Nouy, conforme descrito por Cooper et al. (1979). As diluições dos EB foram preparadas em água desionizada.

3.2.5 Desenho experimental, análise de superfície de resposta e determinação das condições ótimas para produção de biossurfactantes em anaerobiose

Para se determinar os valores ótimos de temperatura e salinidade (variáveis independentes) para produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 em condição anaeróbia, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), método estatístico que permite a variação de todas as variáveis independentes ao mesmo tempo (Sen et al., 2004). O delineamento experimental foi o Composto Central Rotacional (DCCR), através de um esquema fatorial completo (2^2) com quatro pontos axiais (-1,41 e 1,41), quatro pontos cúbicos (-1 e 1) e cinco pontos centrais (0).

Os níveis superior e inferior de cada variável independente estudada foram escolhidos de acordo com trabalhos descritos na literatura especializada e em experimentos preliminares (dados não-mostrados). Os demais níveis foram obtidos de acordo com o planejamento experimental, que constou de 13 ensaios. Os valores das variáveis independentes estudadas estão mostrados na Tabela 4 e a matriz do delineamento é mostrada na Tabela 5. As variáveis independentes foram analisadas em função das variáveis-resposta densidade ótica (DO_{600nm}) máxima, tensão superficial do EB puro e tensão superficial do EB diluído em água desionizada a 75, 50, 35, 25 e 10% da concentração original.

Tabela 4 – Valores das variáveis independentes avaliadas no estudo do crescimento e da produção de biossurfactantes pelos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258

Variáveis Independentes		Níveis de variação				
		-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁	Temperatura (°C)	30	34	45	55	60
X ₂	Salinidade (g L ⁻¹)	0	10,25	35	59,74	70

Tabela 5 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com as variáveis codificadas e decodificadas, utilizado no estudo do crescimento e da produção de biossurfactantes pelos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	X1	X2	Temperatura (°C)	Salinidade (g L ⁻¹)
1	-1	-1	34	10,25
2	1	-1	55	10,25
3	-1	1	34	59,74
4	1	1	55	59,74
5	-1,41	0	30	35,00
6	1,41	0	60	35,00
7	0	-1,41	45	0,00
8	0	1,41	45	70,00
9	0	0	45	35,00
10	0	0	45	35,00
11	0	0	45	35,00
12	0	0	45	35,00
13	0	0	45	35,00

Os resultados experimentais foram avaliados por meio de análises de regressão. A probabilidade de significância do teste p-valor foi empregada para ajustar os modelos através da eliminação dos termos não-significativos ao nível $\alpha = 0,05$. A significância dos modelos foi testada pela análise de variância (ANOVA), usando-se o teste de distribuição F. A pressuposição de normalidade foi testada em todas as análises. A geração do modelo, o processamento dos dados e as análises estatísticas foram elaboradas com o auxílio do programa computacional Minitab, versão 14.

3.3 AVALIAÇÃO DA MOBILIZAÇÃO DE ÓLEO PESADO EM NÚCLEOS POROSOS DE AREIA PELA AÇÃO DE EXTRATOS DE BIOSURFACTANTE

3.3.1 Meio de cultura, preparo dos inóculos e condições de cultivo

Bacillus subtilis LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram reativados em 30 mL de meio mineral MM (Fernandes, 2007) contendo NaCl a $10,2 \text{ g L}^{-1}$ e glicose a 30 g L^{-1} . Os frascos foram incubados por 15 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm.

Para obtenção dos inóculos adaptados à anaerobiose, as células foram centrifugadas a 10.800 g por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Jouan[®] MR-23i), lavadas em solução salina aeróbia a $8,5 \text{ g L}^{-1}$, homogeneizadas e centrifugadas novamente a 10.800 g por mais 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e as células foram introduzidas em câmara anaeróbia (Anaerobic System, modelo 1025, Thermo Forma, USA), lavadas em solução salina anaeróbia a $8,5 \text{ g L}^{-1}$, homogeneizadas e inoculadas em 45 mL do MM anaeróbio contendo NaCl a $10,2 \text{ g L}^{-1}$. As fontes de carbono e nitrogênio foram as mesmas empregadas no item 2.2.2. O volume da suspensão de células adicionado ao meio foi o suficiente para se obter uma densidade ótica inicial ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,1. As culturas foram mantidas em frascos de penicilina de 50 mL lacrados com tampa de borracha e lacres de alumínio, por 18 - 24 h, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm.

As células obtidas na fase anterior foram inoculadas em MM anaeróbio contendo NaCl a $10,2 \text{ g L}^{-1}$ com o auxílio de seringas de 3 mL. Nessa segunda fase de adaptação do inóculo à anaerobiose, o tempo de incubação variou de 12 a 18 h e os frascos foram mantidos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm.

3.3.2 Avaliação da produção de biosurfactante

As culturas anaeróbias foram transferidas para 500 mL de MM anaeróbio contendo NaCl a $10,2 \text{ g L}^{-1}$, sacarose (*B. subtilis* LBBMA 155) ou glicose a 30 g L^{-1} (*B. subtilis spizizenii* LBBMA) e proteose peptona 3 g L^{-1} , contido em frascos erlenmeyer de 1.000 mL. Após a inoculação, os frascos foram lacrados com rolha de borracha e incubados por 120 h a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm.

Todas as soluções-estoque, bem como os meios de cultura, foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min e, na seqüência, desoxigenados por repetidas sessões de evacuação e repressurização com 100 % de N₂. A manipulação das células foi realizada em câmara anaeróbia (Anaerobic System, modelo 1025, Thermo Forma, USA), sob atmosfera de 5 % de CO₂, 10 % de H₂ e 85 % de N₂.

Após o crescimento das culturas, as células foram removidas por centrifugação a 8.700 g (Sorvall[®] - RT6000B, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) por 30 min, em temperatura ambiente e o sobrenadante (livre de células) contendo biossurfactantes foi considerado o extrato de biossurfactantes (EB).

A tensão superficial dos extratos de biossurfactantes (EB) e das diluições dos EB foi avaliada utilizando-se um tensiômetro (Fisher Scientific, modelo 21, Pittsburgh, PA), à temperatura ambiente, pela técnica do anel de Du Nouy, conforme descrito por COOPER et al. (1979). As diluições dos EB foram preparadas em água desionizada.

A diluição micelar crítica (DMC) foi estimada a partir da interseção entre duas retas geradas pelas regressões lineares obtidas através dos valores da tensão superficial *versus* a diluição do meio.

3.3.3 Montagem dos núcleos porosos de areia

Núcleos porosos de areia (Nascimento et al., 2006) foram utilizados para avaliar a mobilização de óleo pesado pelos extratos de biossurfactantes (EB) produzidos em anaerobiose por *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258, e por uma mistura (1:1) desses dois extratos de biossurfactantes. As colunas, construídas em vidro, possuíam 25 mm de diâmetro por 90 mm de comprimento, foram empacotadas a seco com areia de quartzo (150-200 µm) e as extremidades vedadas com estruturas metálicas. Após empacotadas, as colunas foram secas em estufa a 105 °C e submetidas a vácuo (68 kPa, 30 minutos) para remoção do ar.

Às extremidades da coluna, foram conectadas mangueiras MASTERFLEX[®] com diâmetro interno de 0,03 mm (Tygon[®] LFL Tubing L/S[®] 13 ou Tygon[®] Fuel & Lubricant (F-4040-A) Tubing L/S[®] 13, Cole-Parmer, USA). As colunas foram utilizadas na vertical, em fluxo ascendente fornecido por uma bomba peristáltica (MASTERFLEX[®], Cole-Parmer, USA).

As colunas foram saturadas com 15 mL de solução salina (NaCl a 70 g L⁻¹), a um fluxo de 12 mL h⁻¹. Tanto o fluido de injeção quanto as colunas foram mantidas em temperatura ambiente. O efluente foi coletado em seringa de 50 mL e o volume quantificado. O volume poroso (VP) foi determinado pela diferença entre o volume injetado e o volume recuperado no efluente:

$$\text{VP} = \text{Volume}_{\text{injetado}} - \text{Volume}_{\text{efluente}}$$

Após a saturação com solução salina, injetou-se a amostra de óleo (poço RI 49, formação Rio Itaúnas-ES, com 14,4° API e densidade (ρ) de 0,983 g/cm³ a 25 °C). O óleo foi injetado a um fluxo de 0,6 mL h⁻¹. Durante a injeção, o recipiente contendo a amostra foi mantido em banho-maria a 85 °C e as colunas foram mantidas em temperatura ambiente. O petróleo foi injetado até que não fosse observada saída de solução salina no efluente. A solução salina foi recuperada em seringas de 50 mL e utilizada para se determinar o volume de óleo retido no interior dos núcleos porosos.

As colunas receberam aproximadamente 4 volumes porosos de solução salina (NaCl a 70 g L⁻¹), em fluxo entre 3,6 mL h⁻¹ e 4,2 mL h⁻¹. Nessa etapa, tanto o fluido de injeção quanto as colunas foram mantidas em banho-maria a 50 °C, temperatura próxima à encontrada na formação Rio Itaúnas-ES. O efluente (contendo uma mistura de solução salina e petróleo) foi coletado em seringa de 50 mL. Após a separação de fases, o volume de solução salina recuperada foi registrado. O óleo retido na seringa foi solubilizado com THINNER e a solução transferida para béquer de vidro com peso conhecido. Após a evaporação do solvente, a quantidade de óleo recuperado foi estimada pela diferença de peso do béquer vazio e do béquer com petróleo. Os dados foram utilizados para o cálculo da recuperação de petróleo pelo processo de recuperação secundária, bem como do óleo residual na coluna.

Na etapa seguinte (recuperação terciária), as colunas receberam 3 VPs dos extratos de biossurfactantes, a um fluxo entre 3,8 mL h⁻¹ e 4,0 mL h⁻¹. A injeção dos EB foi precedida da injeção de 200 μ L de uma solução de Blue Dextran a 1 g L⁻¹. O efluente foi coletado em seringa de 50 mL até a saída completa do corante da coluna. A partir de então, o efluente foi coletado em nova seringa de 50 mL. Após o término da injeção dos EB e da separação de fases do efluente, determinaram-se os volumes de óleo e da solução salina,

conforme descrito para a fase de recuperação secundária. Os dados foram utilizados para o cálculo da recuperação de petróleo pela injeção de EB e do óleo residual (não-recuperado).

Nos núcleos porosos tratados com os extratos de biossurfactantes de *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 (núcleos NP1 e NP2), injetaram-se 3 VPs dos respectivos EB adicionados do co-surfactante 2,3-butanodiol a 10 mmol L^{-1} . O fluxo dessas soluções foi mantido entre $3,0 \text{ mL h}^{-1}$ e $4,2 \text{ mL h}^{-1}$. O efluente foi coletado e utilizado para se calcular o volume de petróleo recuperado em resposta à aplicação da mistura EB - 2,3-butanodiol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO SALINA NO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS E NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Para cada isolado foram obtidas 3 equações de regressão, correspondentes às três variáveis-resposta utilizadas na análise, a saber: densidade ótica (DO_{600nm}) máxima, tensão superficial do extrato de biosurfactante (EB) e da menor diluição do EB cujas leituras de tensão superficial demonstraram que a concentração de biosurfactante encontrava-se abaixo da concentração micelar crítica (CMC). Nessa condição, há uma relação inversa entre a tensão superficial e a concentração de biosurfactante no meio aquoso.

Todas as variáveis estudadas para o isolado *B. subtilis* LBBMA 155 enquadraram-se em modelos de regressão linear (Tabela 6; Figura 2).

A DO_{600nm} máxima foi influenciada apenas pela temperatura ($p = 0,000$), decrescendo linearmente com o aumento dessa variável (Figura 2A). O maior valor de DO_{600nm} máximo estimado pelo modelo foi de 1,63 (Tabela 6; Figura 2A), na temperatura de 30 °C. Fernandes (2007), trabalhando com esse mesmo isolado e em condições similares às utilizadas neste trabalho, reportou valores de 1,050 para DO_{600nm} máxima a 30 °C. Contudo, naquele trabalho o autor utilizou apenas uma etapa de adaptação do inóculo à condição de anaerobiose.

A tensão superficial (TS) do extrato de biosurfactante do isolado *B. subtilis* LBBMA 155 (EB) foi influenciada pelo efeito linear da temperatura ($p = 0,001$) e da salinidade ($p = 0,001$) (Figuras 2B e 2C).

A linha de contorno para a superfície de resposta do EB de *B. subtilis* LBBMA 155 mostra a faixa de variação da temperatura (30 – 40 °C) e da salinidade (0 – 25 g L⁻¹) onde é possível obter valores de TS abaixo de 30 mN m⁻¹ (Figura 2B). O menor valor de TS estimado pelo modelo foi de 20,15 mN m⁻¹, para a temperatura de 30 °C e sem adição de NaCl (Tabela 6; Figura 2C). Em um ensaio preliminar com o isolado *B. subtilis* LBBMA 155, em condições de cultivo similares às empregadas nesse estudo, obteve-se um valor de TS de 28,6 mN m⁻¹ quando o microrganismo foi cultivado a 30 °C em meio sem adição de NaCl. Em um estudo semelhante, Fernandes (2007) reportou uma TS de 32,6

mN m^{-1} , ao trabalhar com o mesmo isolado, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sem adição de NaCl. A diferença entre o valor predito pelo modelo ($20,15\text{ mN m}^{-1}$) e os valores reais (Tabela 7) é explicada pelo fato de que a TS de uma solução de biossurfactantes não diminui indefinidamente com o aumento da concentração do composto, estabilizando-se quando o mesmo começa a formar micelas, na concentração micelar crítica (Shaw, 1975.).

A TS do extrato de biossurfactante do isolado *B. subtilis* LBBMA 155 diluído a 25% em água (EB a 25%) foi influenciada significativamente pela temperatura ($p = 0,001$) e pela salinidade ($p = 0,003$) (Figuras 2D e 2E). Essa variável aumentou linearmente com o aumento da temperatura e da salinidade. A linha de contorno para a superfície de resposta do EB 25% mostra a faixa de variação da temperatura ($30 < 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) e da salinidade ($0 - 5\text{ g L}^{-1}$) onde é possível obter valores de TS abaixo de 30 mN m^{-1} (Figura 2D). O menor valor de tensão superficial estimado pelo modelo foi de $26,97\text{ mN m}^{-1}$, para a temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sem adição de NaCl (Tabela 6; Figura 2E).

De forma sucinta, o crescimento de *B. subtilis* LBBMA 155 diminui com o aumento da temperatura acima de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a máxima produção de biossurfactantes, em condição de anaerobiose, é obtida a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio de cultura com baixa salinidade.

Tabela 6 - Variáveis resposta, equações estimadas, valores recomendados das variáveis independentes e y estimado (\hat{Y}) obtidos para *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258

Isolado	Variáveis-Resposta	Modelo Estimado	P-valor	Valores Recomendados		\hat{Y}
				T (°C)	S (g L ⁻¹)	
<i>Bacillus subtilis</i> LBBMA 155	DO _{600nm} máxima	Y= 3,16213 - 0,05081*T	0,000	30	0	1,6378
	TS (mN m ⁻¹)	Y= - 6,1416 + 0,8765*T + 0,3914*S	0,000	30	0	20,1534
	EB a 25%	Y= - 2,8041 + 0,9925*T + 0,3851*S	0,001	30	0	26,9709
<i>Bacillus subtilis</i> <i>spizizenii</i> LBBMA 258	DO _{600nm} máxima	Y= 2,93925 - 0,04707*T	0,000	30	0	1,5272
	TS (mN m ⁻¹)	Y= - 71,5166 + 4,4706*T + 0,2636*S - 0,0437*T ²	0,021	30	0	23,2714
	EB a 50%	Y= 7,6922 + 0,8121*T + 0,2976*S	0,002	30	0	32,0552

* - Coeficientes significativos, em nível de 5%.

TS – Tensão Superficial

EB- Extrato de Biossurfactante

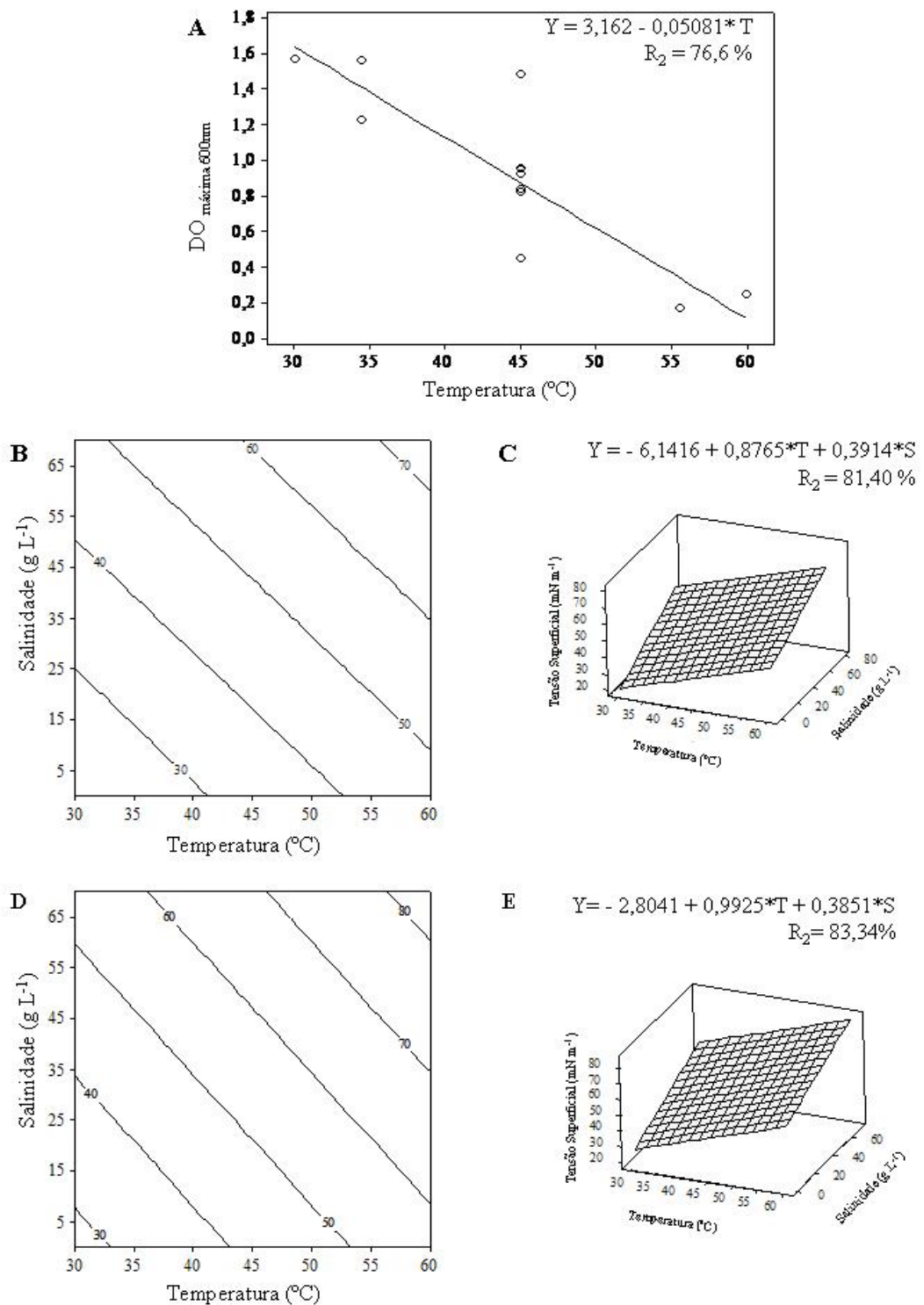


Figura 2 – Modelos de regressão obtidos para Densidade Ótica máxima, tensão superficial do extrato de biossurfactante puro e do extrato diluído em água desionizada (1:3) do isolado *B. subtilis* LBBMA 155. As células foram adaptadas ao crescimento anaeróbico e inoculadas em Meio Mínimo anaeróbico contendo sacarose a 30 g L^{-1} , proteose peptona a 3 g L^{-1} e NaCl (0

a 70 g L^{-1}). As células foram incubadas por 14 - 20 h, a 200 rpm e as temperaturas de incubação foram as determinadas no desenho experimental. **A)** $\text{DO}_{600\text{nm}}$ máxima; **B)** Contorno da Superfície de Resposta (SR) do Extrato de Biossurfactante Puro; **C)** Superfície de Resposta da TS do Extrato de Biossurfactante Puro aos fatores Temperatura e Salinidade; **D)** Contorno da SR do Extrato de Biossurfactante diluído **E)** Superfície de Resposta da TS do Extrato de Biossurfactante diluído aos fatores Temperatura e Salinidade.

A densidade ótica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) máxima estimada para *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 enquadrou-se num modelo de regressão linear ($p = 0,000$) (Tabela 6; Figura 3A), decrescendo linearmente com o aumento da temperatura. O maior valor de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ estimado pelo modelo foi de 1,52 (Tabela 6; Figura 3A), alcançado na temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

A tensão superficial (TS) do extrato de biossurfactante do isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 (EB) foi influenciada pelo efeito quadrático da temperatura ($p = 0,021$) e pelo efeito linear da salinidade ($p = 0,003$) (Tabela 6; Figura 3C).

A linha de contorno para a superfície de resposta do EB de *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 mostra a faixa de variação da temperatura ($30 - 35 \text{ }^\circ\text{C}$) e da salinidade ($0 - 25 \text{ g L}^{-1}$) onde é possível obter valores de tensão superficial abaixo de 30 mN m^{-1} (Figura 3B). O menor valor de tensão superficial estimado pelo modelo foi de $23,27 \text{ mN m}^{-1}$, na temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e sem adição de NaCl (Tabela 6; Figura 3C). Em ensaios preliminares com esse isolado (dados não-mostrados), realizados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e sem adição de NaCl, obtiveram-se extratos de biossurfactantes com valor de tensão superficial de $29,3 \text{ mN m}^{-1}$.

Tabela 7 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 155 com variáveis codificadas e valores experimentais e preditos da densidade ótica (DO_{600nm}) máxima, tensão superficial do extrato de biossurfactante puro e do extrato de biossurfactante a 25%

Ensaio	Variáveis Independentes Descodificadas		Variáveis Resposta					
			Valores Experimentais			Valores Preditos		
	T (°C)	S (g L ⁻¹)	DO _{600nm} máxima	EB puro (mNm ⁻¹)	EB 25% (mNm ⁻¹)	DO _{600nm} máxima	EB puro (mNm ⁻¹)	EB 25% (mNm ⁻¹)
1	34	10,25	1,5620	29,5	32,9	1,4145	28,016	35,280
2	55	10,25	0,1716	47,2	60,8	0,3366	46,609	56,334
3	34	59,74	1,2240	48,2	55,9	1,4145	47,391	54,343
4	55	59,74	0,1689	64,0	68,8	0,3366	65,984	75,397
5	30	35,00	1,5684	31,9	36,6	1,6378	33,853	40,451
6	60	35,00	0,2489	60,8	67,3	0,1134	60,147	70,226
7	45	0,00	0,4495	29,8	34,0	0,8756	33,299	41,858
8	45	70,00	1,4876	59,5	66,0	0,8756	60,701	68,819
9	45	35,00	0,9253	53,0	65,3	0,8756	47,000	55,338
10	45	35,00	0,9558	34,2	48,5	0,8756	47,000	55,338
11	45	35,00	0,8426	56,5	66,7	0,8756	47,000	55,338
12	45	35,00	0,9533	50,6	60,6	0,8756	47,000	55,338
13	45	35,00	0,8247	45,8	56,0	0,8756	47,000	55,338

A TS do extrato de biossurfactante do isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 diluído a 50 % em água (EB a 50%) foi influenciada significativamente pela temperatura ($p = 0,003$) e pela salinidade ($p = 0,008$) (Figuras 3D e 3E). Essa variável aumentou linearmente com o aumento da temperatura e da salinidade. A linha de contorno para a superfície de resposta do EB 50% mostra a faixa de variação da temperatura (30 – 40 °C) e da salinidade (0 – 25 g L⁻¹) onde é possível obter valores de TS abaixo de 40 mN m⁻¹ (Figura 3D). O menor valor de tensão superficial estimado pelo modelo foi de 32,05 mN m⁻¹, obtido na temperatura de 30 °C e sem adição de NaCl (Tabela 6; Figura 3E). Em ensaios preliminares com esse isolado (dados não mostrados), realizados a 30 °C e sem adição de NaCl, obtiveram-se valores de tensão superficial do EB 50% de 32,5 mN m⁻¹, confirmando a capacidade preditiva do modelo gerado.

Em síntese, o crescimento de *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 diminui com o aumento da temperatura acima de 30 °C e a máxima produção de biossurfactantes, em condição de anaerobiose, é obtida a 30 °C em meio de cultura com baixa salinidade.

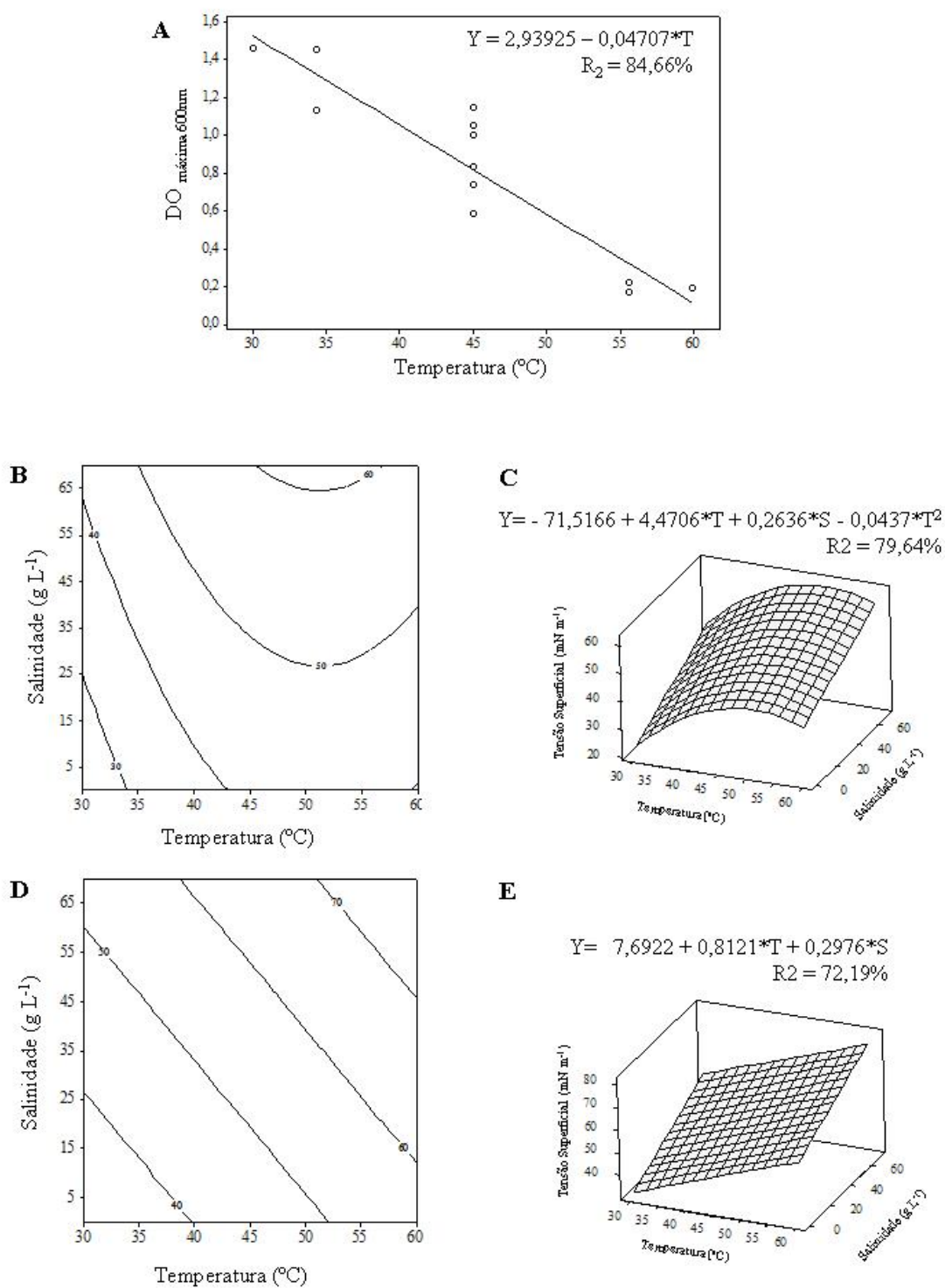


Figura 3 - Modelos de regressão obtidos para Densidade Ótica máxima, tensão superficial do EB puro e diluído do isolado *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258. As células foram adaptadas ao crescimento anaeróbico e inoculadas em Meio Mínimo anaeróbico contendo, glicose a 30 g L⁻¹, proteose peptona 3 g L⁻¹ e NaCl (0 a 70 g L⁻¹). As células foram incubadas por 14 - 20 h, a 200 rpm e as temperaturas de incubação foram as

determinadas no desenho experimental. **A)** DO _{máxima} 600nm; **B)** Contorno da Superfície de Resposta (SR) do Extrato de Biossurfactante Puro; **C)** Superfície de Resposta do Extrato de Biossurfactante Puro; **D)** Contorno da SR do Extrato de Biossurfactante a 50%; **E)** Superfície de Resposta do Extrato de Biossurfactante a 50% aos fatores Temperatura e Salinidade.

Tabela 8 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o isolado *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 com variáveis codificadas e valores experimentais e preditos da densidade ótica (DO_{600nm}) máxima, tensão superficial do extrato de biossurfactante puro e do extrato de biossurfactante a 50%

Ensaio	Variáveis Independentes Descodificadas		Variáveis Resposta					
			Valores Experimentais			Valores Preditos		
	T (°C)	S (g L ⁻¹)	DO _{600nm} máxima	EB puro (mNm ⁻¹)	EB 50 % (mNm ⁻¹)	DO _{600nm} máxima	EB puro (mNm ⁻¹)	EB 50 % (mNm ⁻¹)
1	34	10,25	1,4510	32,1	34,2	1,3205	33,309	38,675
2	55	10,25	0,1644	49,7	60,7	0,3220	44,805	55,903
3	34	59,74	1,1272	45,8	54,5	1,3205	46,356	53,404
4	55	59,74	0,2168	55,8	65,8	0,3220	57,852	70,633
5	30	35,00	1,4580	33,9	40,5	1,5272	32,541	42,472
6	60	35,00	0,1875	46,9	62,5	0,1152	48,799	66,836
7	45	0,00	1,0004	34,1	36,0	0,8212	41,266	44,239
8	45	70,00	0,5816	57,0	59,7	0,8212	59,716	65,069
9	45	35,00	0,8264	55,0	61,9	0,8212	50,491	54,654
10	45	35,00	1,0472	57,0	64,3	0,8212	50,491	54,654
11	45	35,00	1,1460	47,8	59,0	0,8212	50,491	54,654
12	45	35,00	0,7320	46,9	51,1	0,8212	50,491	54,654
13	45	35,00	0,7376	55,1	60,3	0,8212	50,491	54,654

4.2 MOBILIZAÇÃO DE ÓLEO PESADO CONTIDO EM NÚCLEOS POROSOS DE AREIA PELA AÇÃO DE EXTRATOS DE BIOSSURFACTANTES

4.2.1 Caracterização dos Extratos de Biossurfactante

Os biossurfactantes produzidos anaerobicamente por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram capazes de reduzir a tensão superficial do Meio Mínimo (MM) de 54,9 mN m⁻¹ para 26,2 mN m⁻¹ e 28,4 mN m⁻¹, respectivamente (Figura 4; Tabela 9). A solução composta da mistura dos extratos desses dois isolados apresentou valor de tensão superficial (27,5 mN m⁻¹) intermediário entre os valores dos dois extratos puros.

Os valores de tensão superficial dos extratos de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram inferiores ao obtido com o surfactante sintético SDS (35,7 mN m⁻¹), que estava em concentração acima da sua concentração micelar crítica (CMC). O resultado demonstra que os biossurfactantes produzidos por esses dois isolados bacterianos, em condição de anaerobiose, são agentes de superfície eficientes.

Os biossurfactantes produzidos por espécies do gênero *Bacillus*, a exemplo da surfactina, reduzem a tensão superficial para valores próximos a 27 mN m⁻¹ e a tensão interfacial óleo-água de injeção para valores abaixo de 0,01 mN m⁻¹, com concentração micelar crítica (CMC) variando entre 25-180 mg L⁻¹ (Cooper,1981; Lin et al., 1994; Morikawa et al., 2000; Barros et al., 2007; Lima, 2008). Fernandes (2007), trabalhando com os isolados *Bacillus subtilis* LBBMA 155, *Bacillus* sp. LBBMA 111A e *Bacillus* sp. 283, em condições similares às utilizadas neste trabalho, reportou valores de TS de 32,6 mN m⁻¹, 36,6 mN m⁻¹ e 36,2 mN m⁻¹, respectivamente.

A adição do co-surfactante 2,3-butanodiol aos extratos não alterou os valores de tensão superficial (Figura 4; Tabela 9). Maudgalya (2005) e McInerney et al. (2004a) também reportaram que o composto não alterou a tensão interfacial entre os extratos de biossurfactantes produzidos por *Bacillus mojavensis* JF-2 - acrescidos de até 50 g L⁻¹ de NaCl - e petróleo (32 °API).

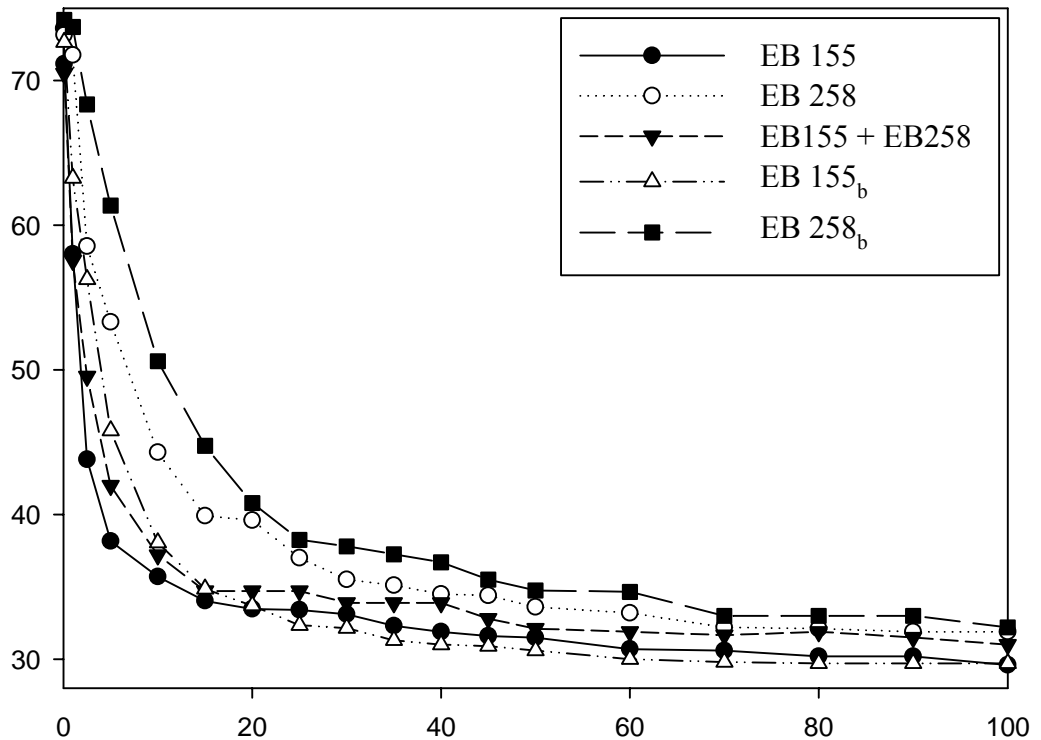


Figura 4 – Relação entre tensão superficial e diluição dos extratos de biossurfactantes em água. **EB 155** – extrato de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LBBMA 155; **EB 258** – extrato de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258; **EB 155 + EB 258** - mistura dos extratos de biossurfactantes dos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258; **EB 155_b** - extrato de biossurfactante produzido por *B. subtilis* LBBMA 155 adicionado do co-surfactante 2,3-butanodiol [0,01 mol L⁻¹] e **EB 258_b** - extrato de biossurfactante produzido por *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 adicionado do co-surfactante 2,3-butanodiol [0,01 mol L⁻¹]. As células foram cultivadas em Meio Mínimo anaeróbio contendo NaCl a 10,2 g L⁻¹, sacarose (*B. subtilis* LBBMA 155) ou glicose (*B. subtilis spizizenii* LBBMA 258) a 30 g L⁻¹ e proteose peptona a 3 g L⁻¹ por 120 h, a 34 °C e 200 rpm.

Tabela 9 – Diluição Micelar Crítica (DMC) dos extratos de biossurfactantes produzidos pelos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258. As células foram cultivadas em Meio Mínimo anaeróbio contendo NaCl a $10,2 \text{ g L}^{-1}$, sacarose (*B. subtilis* LBBMA 155) ou glicose (*B. subtilis spizizenii* LBBMA 258) a 30 g L^{-1} e proteose peptona a 3 g L^{-1} por 120 h, a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm

	TS (mN m^{-1})	DMC
EB 155	26,2	21,0
EB 258	28,4	7,1
EB 155 + EB 258	27,5	16,1
EB 155_b	26,3	7,4
EB 258_b	28,6	4,6

EB 155 – extrato de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LBBMA 155; EB 258 – extrato de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258; EB 155 + EB 258 - mistura dos extratos de biossurfactantes dos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258; EB 155_b - extrato de biossurfactante produzido por *B. subtilis* LBBMA 155 adicionado do co-surfactante 2,3-butanodiol [$0,01 \text{ mol L}^{-1}$] e EB 258_b - extrato de biossurfactante produzido por *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 adicionado do co-surfactante 2,3-butanodiol [$0,01 \text{ mol L}^{-1}$].

A diluição micelar crítica (DMC) do extrato de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 foi 21 (Tabela 9). Esse valor indica que a concentração de biossurfactante no extrato era de 21 vezes a concentração micelar crítica (CMC). O resultado demonstra a elevada eficiência de produção de biossurfactante por esse isolado em condição anaeróbia e confirma o seu elevado potencial para operações de MEOR baseadas na produção de biossurfactantes “in situ”, conforme já reportado por Fernandes (2007).

A produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foi cerca de três vezes inferior à obtida com o isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 155, em relação à CMC.

A DMC da mistura dos extratos de biossurfactantes produzidos pelos dois isolados microbianos foi intermediária entre os valores de DMC reportados para cada um (Tabela 9). Esse resultado é explicado pelo efeito de diluição do extrato mais concentrado (*B. subtilis* LBBMA 155) com o menos concentrado (*B. subtilis spizizenii* LBBMA 258),

obtendo-se com isso uma mistura de concentração intermediária de biossurfactantes. O fato da DMC da mistura ser um pouco acima da DMC média (16,1 X 14,2), na mistura de proporções volumétricas idênticas (1:1) indica a ocorrência de uma interação positiva entre os biossurfactantes produzidos pelos dois isolados, cujo efeito é o aumento da estabilidade das micelas formadas. O fenômeno de aumento da estabilidade de micelas constituídas de misturas de surfactantes sintéticos ou biossurfactantes é reportado na literatura (Akbas et al., 2000; Fuangswasdi et al., 2006; McInerney et al., 2004b; Razafindralambo et al., 1997; Sabatini et al., 2000; Szymczyk et al., 2005; Youssef et al., 2007b).

A adição do co-surfactante 2,3-butanodiol diminuiu a DMC dos extratos de biossurfactantes (Figura 4; Tabela 9), indicando que o composto promoveu uma diminuição na estabilidade das micelas formadas pelos mesmos.

4.2.2 Estudo da Recuperação de Óleo Pesado em Núcleos Porosos de Areia

A injeção de 4 volumes poros (4 VPs) de solução salina ao núcleo poroso NP1 (recuperação secundária) propiciou a recuperação de 36,9% do óleo nele contido (Tabela 10). Durante a etapa de injeção de 3 VPs do extrato de biossurfactante produzido pelo isolado *B. subtilis* LBBMA 155, foi recuperado um volume de óleo correspondente a 5,4% do óleo residual. Na etapa seguinte, na qual injetaram-se 3 VPs do mesmo extrato adicionado do co-surfactante 2,3-butanodiol a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, o volume de óleo recuperado foi o equivalente a 8,7% do óleo ainda contido no núcleo poroso. O volume de óleo obtido nas duas etapas de recuperação terciária correspondeu a 13,55% do óleo contido no NP1 após a recuperação secundária (Tabela 10).

No NP2, que recebeu nas fases terciárias extrato de biossurfactante produzido pelo isolado *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258, o volume de óleo recuperado na fase secundária foi equivalente a 13,7% do óleo nele contido. O volume total de óleo recuperado nas duas fases terciárias correspondeu a 17,4% do óleo residual (Tabela 10). Maior eficiência de recuperação na fase terciária foi alcançada pela injeção do extrato do biossurfactante, sem a presença do co-surfactante (Tabela 10). Esse comportamento foi diferente do obtido com o extrato de biossurfactante produzido pelo isolado *B. subtilis* LBBMA 155 (NP1), e demonstra que o biossurfactante produzido por *B. subtilis spizizenii* LBBMA 258 é mais eficiente em recuperar o óleo pesado contido no núcleo poroso, a despeito de se encontrar em menor DMC (Tabela 9).

O 2,3-butanodiol é um álcool, produto final da fermentação anaeróbia de *Bacillus* spp. (Nakano et al., 1997). Seu papel ainda é bem elucidado, mas o composto poderia evitar a formação de cristais líquidos de surfactante e atua como co-surfactante, aumentando eficiência do biossurfactante (Maudgalya, 2005) e a sua eficiência na recuperação de óleo (McInerney et al. , 2003a).

O volume de óleo removido durante a recuperação secundária foi equivalente a 36,3% do óleo contido no NP3 (Tabela 10), valor similar ao obtido no NP1. Na fase de recuperação terciária, em que se aplicaram 3 VPs da mistura dos extratos de biossurfactantes produzidos pelos dois isolados de *Bacillus*, foram recuperados 9% do óleo retido. Esse valor é intermediário entre os valores de recuperação terciária alcançados pelos extratos individuais (NP1 e NP2, Tabela 10), e é coerente com a observação de que a DMC da mistura de biossurfactantes foi também um valor intermediário entre as DMCs dos extratos de cada um dos isolados (Tabela 9).

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que os extratos de biossurfactantes produzidos pelos isolados *B. subtilis* LBBMA 155 e *B. subtilis spizizenii* 258 são eficientes na mobilização de óleo pesado (14 °API) contido em núcleos porosos de areia, quando comparados com os da literatura. A título de exemplo, Okpokwasili et al. (2006) obtiveram uma recuperação equivalente a 37,82 % de óleo residual de núcleos porosos de areia, ao injetarem 1,5 VPs de extrato de biossurfactante produzidos por *Pseudomonas* sp., sem purificação. Contudo, naquele trabalho os autores utilizaram uma amostra de óleo muito mais leve (> 31,1 °API) do que o empregado em nosso estudo (14 °API).

Em experimentos com colunas de arenito Berea, McInerney *et al.* (2004a) obtiveram uma recuperação média de petróleo residual (32 °API) em torno de 17,45%, ao injetarem biossurfactante produzido por *Bacillus mojavensis* JF-2 a 21 mg L⁻¹. Ao aumentarem a concentração do biossurfactante para 39 mg L⁻¹, os autores duplicaram a eficiência de recuperação de óleo.

Youssef *et al.* (2007a) demonstraram que pelo menos 11 mg L⁻¹ de biossurfactante lipopeptídico são necessários para mobilizar o óleo residual de um núcleo poroso de areia, e que valores de recuperação de óleo residual acima de 40% são alcançados quando concentrações de biossurfactante lipopeptídico acima de 38 mg L⁻¹ são empregadas.

Lima (2008) identificou o biossurfactante produzido em aerobiose por *Bacillus subtilis* LBBMA 155 como surfactina. Esse biossurfactante apresentou uma CMC de 180

mg L⁻¹, tolerância à salinidade de até 50 g L⁻¹, faixa de pH funcional entre pH 6,5 - 7,0 e tolerância à temperatura de até 50°C para atividade tensoativa e de emulsificação com querosene (Lima 2008).

Tabela 10 – Volume de óleo recuperado nos núcleos porosos de areia, pelo processos de recuperação primária e secundária. Os EB injetados na recuperação secundária foram: **Núcleo 1** - injeção do EB de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e da mistura desse EB + 2,3-butanodiol [0,01 M]; **Núcleo 2** - injeção do EB de *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 e da mistura desse EB + 2,3-butanodiol [0,01 M] e **Núcleo 3** - injeção de mistura de proporção volumétrica igual do EB de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258.

		Núcleos de Areia			
		1	2	3	
Recuperação Secundária	<i>Petróleo Retido (mL):</i>	6,0000	5,0000	5,7500	
	<i>Vol. Recuperado (mL):</i>	2,0984	0,6500	1,9796	
	<i>Perda (%):</i>	5,2456	5,2456	5,2456	
	<i>Vol. Recuperado CORRIGIDO (mL):</i>	2,2144	0,6859	2,0891	
	<i>Recuperação (%)</i>	36,9073	13,7189	36,3316	
Recuperação Terciária	<i>Petróleo Retido (mL):</i>	3,7856	4,3141	3,6609	
	<i>Vol. Recuperado (mL):</i>	0,1935	0,5734	0,3115	
	Extrato de biossurfactante	<i>Perda (%):</i>	5,2456	5,2456	5,2456
	<i>Vol. Recuperado CORRIGIDO (mL):</i>	0,2042	0,6051	0,3287	
	<i>Recuperação (%)</i>	5,3942	14,0264	8,9793	
	<i>Petróleo Retido (mL):</i>	3,5814	3,7089		
	<i>Vol. Recuperado (mL):</i>	0,2926	0,1390		
	Extrato de biossurfactante + 2,3 - butanodiol [0,01M]	<i>Perda (%):</i>	5,2456	5,2456	
	<i>Vol. Recuperado CORRIGIDO (mL):</i>	0,3088	0,1467		
	<i>Recuperação (%)</i>	8,6219	3,9549		
TOTAL	<i>Petróleo Retido (mL):</i>	3,7856	4,3141		
	<i>Vol. Recuperado (mL):</i>	0,5130	0,7518		
	<i>Recuperação (%)</i>	13,5510	17,4266		

5. CONCLUSÕES

Os isolados de *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 foram capazes de produzir biossurfactantes em anaerobiose. E o crescimento desse isolados foi influenciada pela temperatura e produção de biossurfactante foi influenciada pela temperatura e pela salinidade.

A injeção de 3 volumes porosos do extrato de biossurfactante (EB) produzidos por *subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 removeram em média 9,43 % de petróleo residual (14 °API) em experimentos com núcleos porosos de areia.

A da mistura dos extratos de biossurfactantes produzidos pelos dois isolados microbianos obteve valores intermediários DMC e recuperação de petróleo, reportados para cada um.

Os extratos de biossurfactantes (EB) produzidos em anaerobiose por *subtilis* LBBMA 155 e *Bacillus subtilis spizizenii* LBBMA 258 são efetivos na mobilização de óleo pesado em núcleos porosos de areia e com potencial de utilização na recuperação avançada melhorada por microrganismos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbas, H.; Iscan, M. & Sidim, T. Composition of Mixed Anionic/Nonionic Surfactant Micelles. **Journal of Surfactants and Detergents**, volume 3, nº 1, Janeiro 2000.

Banat, I. M. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A Review. **Bioresource Technology**, volume 51, p. 1-12, 1995.

Banat, I. M.; Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, volume 53, p. 495-508, 2000.

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

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.

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

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

Batista, S. B.; Mounteer, A. H.; Amorim, F. R. & Tótola, M. R. Isolation and Characterization of Biosurfactant/Bioemulsifier-Producing Bacteria from Petroleum Contaminated Sites. **Bioresource Technology**, volume 97, p. 868-875, 2006.

BP Statistical Review of World Energy June 2007. Disponível online <http://www.bp.com/productlanding.do?categoryId=6848&contentId=7033471>. Acessado em 18/06/2007.

Bryant, R. S. MEOR: Screening Criteria Fit 27% of U.S. Oil Reservoirs. **Oil & Gas Journal**, volume 89, p. 56-59, 1991.

Cameotra, S. S. & Makkar, R. S. Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions. **Applied Microbial Biotechnology**, volume 50, p. 520-529, 1998.

Canuto, J. R. Petróleo. Disponível online em <http://www.igc.usp.br/geologia/petroleo.php>. Acessado em 20/05/2007.

Cleveland, C. J.; Costanza, R.; Hall, C. A. S. & Kaufmann, R. Energy and the U.S. Economy: A Biophysical Perspective. **Science**, vol. 225, nº 4665, p. 890 – 897, 1984. *In* HALL, C.; THARAKAN, P.; HALLOCK, J. & CLEVELAND, C.; JEFFERSON, M. Hydrocarbons and the evolution of human culture. **Nature**, vol 426, 2003.

Cooper, D. G.; Macdonald, C. R.; Duff, S. J. B. & Kosaric, N. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied and Environmental Microbiology**, volume 42, nº 3, p. 408-412, Setembro 1981.

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

CRUZ, R.; Hoffmann, T.; Marino, M.; Nedjari, H.; Preseca-Siedel, E.; Dressen, O.; Glaserr, P. & Jahn, D. Fermentative metabolism *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of genes expression. **Journal of Bacteriology**, volume 182, nº 1, p. 3072-3080, 2000.

Desai, J. D. & Banat, I. M. Microbial Production Of Surfactants And Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, volume 61, nº 1, p. 47–64, 1997.

Doe - U.S. Department Of Energy. Washington, DC. Disponível online em <http://www.energy.gov/index.htm> . Acessado em 05/05/2007.

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

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

Fuangswasdi, A.; Charoensaeng, A. ; Sabatini, D. A.; Scamehorn, J. F.; Acosta, E. J.; Osathaphan, K. & Khaodhiar, S. Mixtures of Anionic and Cationic Surfactants with Single and Twin Head Groups: Solubilization and Adsolubilization of Styrene and Ethylcyclohexane. **Journal of Surfactants And Detergents**, volume 9, nº 1, 2006.

Hall, C.; Tharakan, P.; Hallock, J.; Cleveland, C. & Jefferson, M. Hydrocarbons and the Evolution of Human Culture. **Nature**, volume 426, Novembro 2003.

Jacques, P. ; Hbid, C. ; Destain, J. ; Razafindralambo, H. ; Paquot, M. ; Pauw, E. De & Thonart, P. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, volume 77–79, p. 223-233, 1999.

Javaheri, M., Jenneman, G. E., McInerney, M. J. & Knapp, R. M. Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, volume 50, nº 3, p. 698-700, 1985.

Kaneda, T. Iso- and anteiso-fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. **Microbiological Reviews**, volume 55, nº 2, p. 288-302, 1991.

Kearns, D. B. & Losick, R. Swarming Motility in Undomesticated *Bacillus Subtilis*. **Molecular Microbiology**, volume 49, nº 3, p. 581–590, 2003.

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

Lin, S.-C.; Minton, M. A.; Sharma, M. M. & Georgiou, G. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, volume 60, nº 1, p. 31-38, 1994.

Lin, S. - C. **Biosurfactant: Recent Advances. Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, volume 63, nº 2, p. 109–120, 1996.

Lin, S. –C .; Chen, Y.–C. & Lin, Y. –M. General Approach for the Development of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Biosurfactant Analysis and Purification. **Journal of Chromatography A**, volume 825, p. 149–159, 1998.

Liu, Q.; Dong, M.; Zhou, W.; Ayub, M.; Zhang, Y.P. & Huang, S. Improved Oil Recovery by Adsorption–Desorption in Chemical Flooding. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, volume 43, p. 75–86, 2004.

Makkar, R. S. & Cameotra S.S. Biosurfactant Production by a Thermophilic *Bacillus Subtilis* Strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, volume 18, p. 37–42, 1997

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

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

McInerney, M. J.; Han, S.O.; Maudgalya, S.; Mouttaki, H.; Folmsbee, M.; Knapp, R.; Nagle, D.; Jackson, B. E.; Staudt, M.; Frye, W. Development of More Effective Biosurfactants for Enhanced Oil Recovery. **Final Report**, Janeiro 2003a.

McInerney, M. J.; Knapp, R. M.; Nagle, D.; Duncan, K.; Youssef, N.; Folmsbee, M. J. & Maudgalya, S. Development of Microorganisms With Improved Transport and Biosurfactant Activity for Enhanced Oil Recovery. **Annual Report**. Junho 2003b.

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

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

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.

Morikawa, M.; Hirata, Y. & Imanaka, T. A Study on the Structure - Function Relationship of Lipopeptide Biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, volume 1488, p. 211-218, 2000.

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

Nadarajah, N.; Singh, A. & Ward, O. P. De-emulsification of Petroleum Oil Emulsion by a Mixed Bacterial Culture. **Process Biochemistry**, volume 37, p. 1135–1141, 2002.

Nakano, M. M.; Dailly, Y. P.; Zuber, P. & Clark, D. P. Characterization of Anaerobic Fermentative Growth in *Bacillus Subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for The Growth. **Journal of Bacteriology**, volume 179, n° 21, p. 6749–6755, 1997.

Nakano, N. M. & Zuber, P. Anaerobic Growth of a “Strict Aerobe” (*Bacillus subtilis*). **Annual Review of Microbiology**, volume 52, p. 165–190, 1998.

Nakano, N. M. & Zuber, P. Anaerobiosis. p. 393-404. *In* Sonenshein, A. L; Hoch, A. J. & Losick R. (Org.). *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells. 629 p. **ASM Press**, Washington, DC, 2002.

Nascimento, A. G.; Tótola, M. R.; Souza, C. S.; Borges, M. T. & Borges, A. C. Temporal and Spatial Dynamics of Blocking and Ripening Effects on Bacterial Transport Through a Porous System: A Possible Explanation for CFT Deviation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, volume 53, p. 241–244, 2006.

Nazina, T. N.; Sokolova, D. Sh.; Grigor’yan, A. A.; Xue, Y.-F.; Belyaev, S. S. & Ivanov, M. V. Production of Oil-Releasing Compounds by Microorganisms from the Daqing Oil Field, China. **Microbiology**, volume 72, n° 2, p. 173–17, 2003.

Nitschke, M & Pastore, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, volume 25, n° 5, p. 772-776, 2002.

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

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

Ohno, A.; Ano, T. & Shoda, M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, volume 80, nº 5, p. 517-519, 1995.

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

Planckaert, M. Oil Reservoirs and Oil production. p. 3-20. *In* Ollivier, B.; Magot, M. (Org.). **Petroleum microbiology**. ASM Press, Washington DC. 2005.

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

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

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

Sen, R. & Swaminathan, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, volume 47, p. 358-363, 1997.

Sen, R. & Swaminathan, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, volume 21, p. 141–148, 2004.

Sen, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, disponível em www.elsevier.com/locate/pecs, acesso 4-09-2008.

Sepahy, A. A.; Assadi, M. M.; Saggadian, V. & Noohi, A. Production of Biosurfactant from Iranian Oil Fields by Isolated *Bacilli*. **International Journal of Environmental Science & Technology**, volume 1, Nº 4, p. 287-293, 2005.

Shaw, D. **Introdução a Química dos Colóides e de Superfície**. Editora Edgard Blucher Ltda. Tradução: Maar, J. H. (Instituto de Química da UNICAMP). Editora da USP. 1975.

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

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

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

White D. The **Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. 2ª Edição. Oxford University Press, New York. 2000.

Yakimov, M. M.; Timmis, K. N.; Wray, V. & Fredrickson, H.L. Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied And Environmental Microbiology**, volume 61, nº5, p. 1706-1713, 1995.

Yakimov, M. M.; Amro, M. M.; Bock, M.; Boseker, K.; Fredrickson, H. L.; Kessel, D. G.; Timmis, K. N. The Potential of *Bacillus licheniformis* Strains for in Situ Enhanced Oil Recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, volume 18, p. 147-160, 1997.

Youssef, N. H.; Duncan, K. E.; Nagle, D. P.; Savage, K. N.; Knapp, R. M. & McInerney, M. J. Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production By Diverse Microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, volume 56, p. 339– 347, 2004.

Youssef, N.; Simpson, D. R.; Duncan, K. E.; McInerney, M. J.; Folmsbee, M.; Fincher, T. & Knapp, R. M. In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, volume 73, nº 04, p. 1239-1247, Fevereiro 2007a.

Youssef, N. H.; Nguyen, T.; Sabatini, D. A. & McInerney, M. J. Basis for Formulating Biosurfactant Mixtures to Achieve Ultra Low Interfacial Tension Values Against Hydrocarbons. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, volume 34, p. 497-507, Julho 2007b.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)