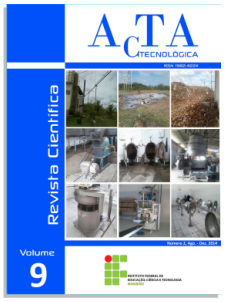
ENGENHARIA QUÍMICA

Acta Tecnológica, Vol. 9, N° 2 (2014), 48 - 57

Acta Tecnológica

http://portaldeperiodicos.ifma.edu.br/



Bactérias para aplicação em recuperação avançada de petróleo

Vilma Bragas de Oliveira*[1], Marcos Rogério Tótola[2], Antonio Galvão do Nascimento[2], Arnaldo Chaer Borges[2], Maria Catarina Megumi Kasuy[2]

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar microrganismos com potencial para uso em recuperação avançada de petróleo melhorada por microorganismos. A triagem foi realizada com isolados microbianos de dois grupos distintos, denominados REGAP (Refinaria Gabriel Passos)/REDUC (Refinaria Duque de Caxias) e Jazida, coletados a partir de água de produção de petróleo, solo e água contaminados com hidrocarbonetos, e de borra de óleo. Entre 244 linhagens, cinco foram selecionados por seu potencial para serem usados em MEOR (Recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos). Este é o primeiro relato dos atributos de Bacillus amyloliquefaciens evidenciando o seu potencial para uso na recuperação avançada de petróleo melhorada por microorganismos.

Termos para indexação: *Bacillus amyloliquefaciens*; MEOR; Biotecnologia.

Bacteria for application in advanced oil recovery

ABSTRACT

This work aimed to select and characterize microorganisms with potential for use in advanced oil recovery enhanced by microorganisms. The screening was conducted with microbe isolate from two distinct groups, named REGAP (Gabriel Passos Refinery)/REDUC (Duque de Caxias Refinery) and Jazida, collected from the water of petroleum production, soil and water contaminated with hydrocarbon, and from oil sludge. Among 244 strains, five were selected for their potential to be used in MEOR (Enhanced oil recovery improved by microorganisms). This is the first report of the attributes of Bacillus amyloliquefaciens evidencing its potential for use in advanced petroleum enhanced by microorganisms

Index terms: *Bacillus amyloliquefaciens; MEOR; Biotechnology.*

[1] Departamento de Química e Biologia – Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) - Centro de Estudos Superiores de Caxias – Morro do Alecrim s/n CEP 65604-380 – Caxias - MA. *vilbragas@hotmail.com.

[2] Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário CEP: 36570-000 - Viçosa – MG.

INTRODUÇÃO

A produção de petróleo é conduzida em três estágios: primário, secundário e terciário. A produção primária baseia-se na utilização da pressão interna natural do reservatório. Quando a pressão diminui a ponto de provocar uma queda ou mesmo de cessar a produção de óleo, aplica-se o método de recuperação secundária, que utiliza a injeção de água para elevar a pressão interna e forçar a saída do óleo. Essa estratégia é empregada até que o balanço de óleo produzido por volume de água injetada é desequilibrado e a quantidade de água ultrapassa a do óleo, tornando o método economicamente inviável (KHIRE e KHAN, 1994). Esses dois métodos de extração de petróleo geram um fator médio de recuperação entre 20 a 30% (BANAT, 1993), valores considerados baixos, se considerarmos as enormes estruturas e avançadas tecnologias aplicadas no processo de extração. O fator de recuperação pode ser elevado com a aplicação de métodos de recuperação terciária (STEPHENS, 1999). A produção terciária de petróleo, também denominada como recuperação avançada de petróleo (EOR), envolve a aplicação de energia térmica e/ou química com a finalidade de aumentar o fator de recuperação e a vida útil das jazidas de petróleo (BACHMANN et al, 2014).

Recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos (MEOR) é também um método de recuperação terciária. Os primeiros estudos sobre MEOR foram realizados com métodos desenvolvidos por Zobell, o qual utilizava uma mistura de areia e calcário triturado, saturada com óleo cru e posteriormente inoculada com suspensão bacteriana. O óleo que foi gradualmente liberado do meio sólido foi medido gravimetricamente ou volumetricamente. Modificações posteriores no estudo de MEOR envolveram pesquisas realizadas diretamente sobre o comportamento do petróleo no interior do reservatório tratado (GAO et al, 2014).

As pesquisas sobre processos MEOR apresentam dois níveis distintos: em escala laboratorial e experimentos de campo. No laboratório, microrganismos promissores são isolados e selecionados quanto à produção de metabólitos desejáveis para mobilização do óleo. Esses microrganismos são, então, utilizados em experimentos de bancada para demonstração de que o óleo pode ser removido de sistemas porosos saturados com óleo. Nos experimentos de campo, microrganismos selecionados são injetados com nutrientes capazes de suportar o seu crescimento e a produção de metabólitos considerados úteis para liberar o óleo aprisionado (MCINERNEY et al, 1999). Outra alternativa é estimular o crescimento da microbiota indígena apenas por meio da injeção de nutrientes. Essas estratégias são caracterizadas como sendo de aplicação *in situ*. Uma variante desses mecanismos é a produção em larga escala de bioprodutos úteis a MEOR, em biorreatores, e a posterior injeção nos reservatórios, caracterizando o mecanismo ex situ (MCINERNEY et al, 1999).

Temperatura, pressão, salinidade, porosidade e permeabilidade das rochas, densidade do óleo, disponibilidade de nutrientes e a concentração de oxigênio são os principais fatores a serem considerados quando se utilizam microrganismos em recuperação avançada de petróleo através do mecanismo *in situ*.

O aumento do número de projetos de campo de MEOR e a variedade dos diferentes processos microbianos que são aplicados demonstram a dificuldade em se enquadrar as limitações dos reservatórios a esta tecnologia. Logo, o processo microbiano só deve ser aplicado com prévio conhecimento das características do reservatório (BRYANT, 1991).

Para aplicação *in situ*, microrganismos anaeróbios facultativos são preferidos, em razão de o ambiente encontrado nas jazidas de petróleo apresentar limitação de oxigênio. A injeção dos microrganismos é feita em solução aquosa, o que requer tolerância a oxigênio e a capacidade de fermentar ou de utilizar outro aceptor final de elétrons na sua ausência (NAKANO et al, 1997; CLEMENT et al, 1997).

As altas temperaturas, juntamente com as altas salinidades, limitam o metabolismo dos microrganismos nas jazidas. Mesmo assim, trabalhos relatam o isolamento de bactérias halofílicas termotolerantes (*Thermoanaerobacter, Thermoanaerobium e Fervidobacterium*), de águas de reservatório de petróleo localizadas na Austrália (JENNEMAN, 1989).

Bactérias redutoras de sulfato são indesejáveis para o uso em processos de MEOR, pois o H2S resultante é altamente reativo na presença de ferro, provocando sua corrosão por oxidação, acarretando graves problemas aos equipamentos de extração (YONEBAYASHI , 2000). Esses microrganismos são frequentemente detectados em procedimentos de isolamento e caracterização da microbiota de reservatórios de óleo (BUBELA, 1989).

Uma vantagem da MEOR como método de recuperação é que este processo é economicamente atrativo, tendo em vista que é aplicado especialmente em campos de produção de óleo inativados e que já possuem os

equipamentos instalados para injeção de água. Além disso, pode ser aplicado tanto para óleos leves como pesados (BRYANT et al, 1993).

Sob a ótica de aplicação in situ (produção do metabólito no interior da jazida) ou ex situ (produção do metabólito em biorreatores e posterior injeção destes nas jazidas), a tecnologia MEOR lança mão dos produtos do metabolismo microbiano, a fim de que esses ajam sobre o óleo ou na formação rochosa e aumentem a mobilidade do óleo e, consequentemente, o fator de recuperação (SPERL e SPERL, 1993). A Tabela 1 sumariza os bioprodutos e sua contribuição para a recuperação avançada de petróleo.

Tabela 1: Relação dos bioprodutos microbianos e sua contribuição para tecnologia de recuperação avançada de petróleo.

Bioproduto	Efeito
Biopolímeros	Tamponamento de zonas de alta permeabilidade Redução da viscosidade do óleo Emulsificação do óleo
Biossurfactantes	Redução das tensões superficiais e interfaciais Emulsificação do óleo
Gases	Repressurização do reservatório Redução da viscosidade do óleo Expansão volumétrica do óleo
Ácidos	Alteração da porosidade e permeabilidade das rochas do reservatório Reação com rochas carbonáceas e produção de CO_2 Co-surfactantes
Solventes	Dissolução do óleo

O aumento da produção de óleo em poços em que ocorreu a redução na vazão e na produção, em decorrência do desvio da água de injeção das zonas de baixa permeabilidade para as zonas de alta permeabilidade, é tecnicamente viável. Isso foi demonstrado através da estimulação de uma comunidade microbiana indígena capaz de mineralizar melaço e usar nitrato como aceptor final de elétrons (MCINERNEY et al, 1999).

O melaço é um subproduto da indústria de beneficiamento de cana-de-açúcar e é vendido a baixos custos para complementação nutritiva de ração animal ou, em alguns casos, é descartado. Pesquisas recentes demonstram a larga aplicabilidade desse material na tecnologia MEOR como fonte de carbono e energia, dado o alto teor de açúcares fermentáveis (WANG, 1993; STEPHENS, 2000). Isso torna a aplicação de melaço extremamente atrativa do ponto de vista econômico, pois em adição aos vários litros de óleo que são recuperados, só aumenta o custo do petróleo em cerca de três dólares por barril (TREBAU et al, 1999). Várias fontes de carbono, incluindo os monossacarídeos, arabinose, glicose, maltose, galactose e outras não foram melhores que o melaço em estimular o crescimento microbiano (KNAPP, 1993).

Os constituintes inorgânicos em ecossistemas de campos produtores de petróleo podem ser manipulados, mas, em geral, são poucos os parâmetros que podem ser modificados. Dessa forma, torna-se mais conveniente conhecer as características de sobrevivência dos microrganismos e adequá-los a essas condições, com vistas ao aumento da taxa de crescimento e da sua atividade metabólica (YONEBAYASHI, 2000; SPERL, 1993).

Este trabalho teve como objetivo selecionar, dentre vários isolados microbianos provenientes de locais de exploração de petróleo, de locais de armazenamento de óleo cru ou com histórico de contaminação por petróleo ou derivados, aqueles que apresentam perfil fisiológico requerido para sua aplicação em MEOR e caracterizar os isolados selecionados.

METODOLOGIA

Os trabalhos foram executados no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia (DMB), instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Foram empregadas duas seqüências de caracterização distintas no que se refere a aspectos fisiológicos para os isolados da coleção do LBBMA, constituintes do Grupo REGAP/REDUC e do Grupo Jazida, considerando que não havia informações detalhadas sobre estes microrganismos para se avaliar o seu potencial para aplicação na tecnologia MEOR. A Figura 1 ilustra as seqüências empregadas na triagem dos isolados com potencial de aplicação em MEOR.

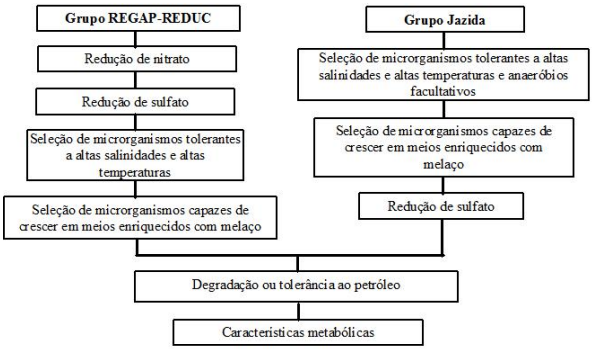


Figura 1: Sequencia empregada na triagem dos isolados com potencial de aplicação em MEOR.

Grupo REGAP/REDUC

Redução de nitrato

Os isolados microbianos foram obtidos a partir de amostras de solo, água de lagoa aerada, óleo bruto, borra oleosa e água e sedimentos de mangue coletados nas refinarias Gabriel passos (Betim – MG) e Duque de Caxias (Duque de Caxias - RJ) (Grupo REGAP/REDUC). Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio R2A (REASONER, 1985) e incubados por 24 horas a 30°C. A seguir, as colônias foram transferidas para tubos contendo 10 mL de meio ágar nutriente (GERHARDT, 1994) com ágar a 0,17% (p/v).

O ensaio para detecção de desnitrificantes foi realizado após 24 horas de incubação a 30°C, adicionando-se volumes iguais de soluções ácidas de 1-[N-(1-naftil)-dihidrocloreto de etilenodiamina] 0,2g L^{-1} e ácido sulfanílico 10g L^{-1} ao tubo contendo a cultura. A formação de uma coloração rósea persistente foi a indicação de resultado positivo. Em caso de ausência de cor, foi realizada a adição de 5g L^{-1} de zinco em pó para confirmação do resultado negativo (GERHARDT, 1994).

Redução de sulfato

O teste de redução de sulfato foi realizado inoculando-se os isolados que apresentaram resultado positivo no teste de redução de nitrato em tubos contendo 10 mL de meio Postgate com ágar 0,3% (p/v) (YONEBAYASHI, 2000). A redução do sulfato foi observada pela formação de precipitado escuro, resultado da reação do H_2S produzido com o ferro presente no meio de cultivo. Esta metodologia também foi utilizado para o grupo Jazida.

Seleção de microrganismos tolerantes a altas salinidades e altas temperaturas

Os isolados com resultado positivo no teste para redução do nitrato, porém com resultado negativo no teste de redução de sulfato, foram inoculados em tubos contendo 10 mL de caldo nutriente enriquecido com KNO_3 a 0,1% (p/v), sacarose a 1% (p/v) e NaCl nas concentrações de 2 ou 5% (p/v). O oxigênio presente no meio foi eliminado por aquecimento a 100oC por 10 minutos. Após inoculação, os tubos foram incubados a 50°C em câmara anaeróbica (Anaerobic System THERMOFORMA), sob atmosfera de 5% de CO_2, 10% de H_2 e 85% de N_2. O crescimento foi observado pelo desenvolvimento de turvação do meio de cultura.

Seleção de microrganismos capazes de crescer em meios enriquecidos com melaço

Para a seleção de microrganismos capazes de crescer em meios enriquecidos com melaço, foram testados o meio mineral (MARGESIN, 1997) e o meio E (CLARK, 1981) adicionados de melaço em quantidade suficiente para se obter 1oBrix (STEPHENS, 2000; KNAPP, 1993). A faixa de tolerância à salinidade foi determinada nesses meios acrescidos de NaCl em concentrações que variaram de 2 a 8% (p/v).

O melaço foi obtido da Usina Pontenovense – Jetiboca, em Ponte Nova – MG, diluído 1:1 (v/v) em fosfato de sódio monobásico 1,5g L^{-1} e autoclavado a 121°C por 30 minutos. Após 24 horas de repouso, a fase superior foi sifonada e congelada para uso posterior. Após a clarificação, o melaço foi analisado quanto aos teores de açúcares redutores em densímetro de Brix (42°Brix), de nitrogênio pelo método Kjedahl (CLESCERL, 1999) (560mg L^{-1}), de fósforo pelo método do cloreto estanhoso (CLESCERL, 1999) (1749,59mg L^{-1}) e de carboidratos totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS, 1956) (3400µg mL^{-1}). Os dados constantes entre parênteses são os resultados obtidos em cada análise.

Grupo Jazida

Seleção de microrganismos tolerantes a altas salinidades e altas temperaturas e anaeróbios facultativos

Os isolados microbianos obtidos de amostras de água de injeção e de óleo bruto (Grupo Jazida), foram repicados para placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente (GERHARDT, 1994) e incubados a 50oC sob condições de aerobiose. Os que apresentaram crescimento foram repicados para placas de Petri contendo o meio mineral ou meio E, adicionados de melaço em q.s.p. 1°Brix e NaCl a 3, 6 ou 9% (p/v). Após inoculação, as placas foram incubadas a 50°C em câmara anaeróbica (Anaerobic System THERMOFORMA), sob atmosfera de 5% de CO_2, 10% de H_2 e 85% de N_2. O crescimento foi observado pelo aparecimento de colônias nas placas de Petri.

Seleção de microrganismos capazes de crescer em meios enriquecidos com melaço

Os isolados que apresentaram crescimento em pelo menos uma das condições testadas anteriormente foram repicados para placas de Petri contendo meio mineral ou meio E com teor de NaCl ajustado entre 2 e 9 (intervalos de 1%) ou 12% (p/v) e melaço em q.s.p. 1°Brix. A incubação foi realizada em câmara anaeróbica a 50°C. O crescimento foi observado pelo aparecimento de colônias nas placas de Petri.

Degradação ou tolerância ao petróleo

Os isolados selecionados foram inoculados em frascos Erlemeyer contendo 125 mL de meio mineral adicionados de 2% de NaCl, na presença de petróleo a 1% (v/v), de petróleo a 1% e melaço em q.s.p. 1ºBrix, ou melaço em q.s.p. 1ºBrix. Os frascos foram incubados em condições de anaerobiose, a 50ºC. O crescimento microbiano foi avaliado após 1, 3, 7 e 14 dias de incubação, pela leitura da densidade ótica a 600 nm (DO_{600}).

Características metabólicas

Os isolados selecionados foram ensaiados quanto a características metabólicas consideradas como desejáveis para sua utilização em MEOR. Para esse fim, todos os isolados foram cultivados em meio mineral com NaCl a 2% (p/v) e melaço em q.s.p. 1ºBrix. A incubação foi realizada em câmara anaeróbica, a 50ºC. A produção de ácidos foi avaliada por indicação da ocorrência de redução no pH do meio. A produção de gases foi avaliada utilizando-se tubos de Durhan. A produção de biossurfactantes foi avaliada pelo método qualitativo do colapso da gota em placa untada com óleo lubrificante Castrol GTX Magnatec, medindo-se a tensão superficial (BODOUR, 1998). A produção de polímeros extracelulares foi testada pelo método da alça de repicagem flambada (LARPIN, 2002). Todas as avaliações foram realizadas nos tempos 1, 2, 3, 5 e 10 dias de incubação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grupo REGAP-REDUC

O denominado grupo REGAP/REDUC está constituído por um total de 190 isolados bacterianos, 17 deles provenientes de isolamentos a partir de amostras de água de lagoa aerada ou de mangue, 15 de amostras de borra oleosa e 158 de amostras de solo ou sedimento contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. A característica de reduzir o nitrato foi constatada em 30% dos isolados, dentre os quais 51 originaram-se dos isolamentos efetuados com as amostras de solo ou sedimento contaminados com óleo, 5 foram provenientes de amostras de água e apenas 1 de borra oleosa (dados não mostrados). Nesse grupo de 57 redutores de nitrato, apenas 16 mostraram-se capazes de utilizar o sulfato como aceptor de elétrons, sendo 2 provenientes de amostras de água e 14 de amostras de solo ou sedimento. A continuação do trabalho de triagem de isolados com potencial para uso em MEOR limitou-se aos 41 isolados que apresentaram as duas características, ou seja, foram positivos para redução de nitrato e negativos para redução de sulfato (Tabela 2).

Tabela 2: Isolados bacterianos do grupo REGAP/REDUC redutores de nitrato e não redutores de sulfato concomitantemente.

Isolados LBBMA Nº (LBBMA: Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente DMB / UFV)				
01	75	103	126	166
08	81B	105C	138	167
12	84	107C	141	169A
16	86	111A	142	171A
24A	88B	111B	154	171B
28A	89	120A	155	173
59A	91	120B	156	174
62	96	125B	164	200
72				

O cultivo em caldo nutriente em condições anaeróbias revelou que 11 dos 41 isolados não suportam temperatura acima de 40ºC, a saber: LBBMA12, 16, 28A, 59A, 72, 75, 89, 96, 138, 142 e 1 73. Dentre os 30 isolados termófilos anaeróbios, 15 foram capazes de crescer em caldo nutriente adicionado de NaCl a 2 ou 5%: LBBMA 01, 08, 81B, 86, 88B, 91, 103, 111A, 125B, 141, 154, 155, 164, 166 e 200.

Em meio mineral e meio E adicionados de NaCl tendo-se o melaço como fonte de carbono, somente dois dentre os 15 isolados acima apresentaram crescimento (LBBMA155 e 111A) (Tabela 3). Em meio mineral, esses microrganismos demonstraram maior tolerância ao NaCl.

Tabela 3: Crescimento dos isolados LBBMA155 e 111A em meio mineral e meio E enriquecidos com melaço contendo NaCl em diferentes concentrações.

ISOLADO	Meio E							Meio Mineral						
	NaCl (%)													
LBBMA Nº	2	3	4	5	6	7	8	2	3	4	5	6	7	8
111A	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
155	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-

\+ capacidade de crescimento

\- incapacidade de crescimento

Dentre os isolados do grupo REGAP/REDUC, cerca de 30% foram capazes de utilizar o nitrato como aceptor de elétrons. Essa proporção foi encontrada tanto entre os isolados de solo como de água de lagoa aerada e mangue, confirmando que a capacidade de redução do nitrato é uma característica comum em comunidades bacterianas presentes nesses ambientes (ATLAS, 1998). Entretanto, dos 15 isolados de amostra de borra oleosa, somente um apresentou tal característica, o que foi atribuído à escassez de nitrato nesse tipo de resíduo.

As bactérias redutoras de sulfato foram manipuladas em condições aeróbias, fato que contradiz a descrição usual desse grupo de microrganismos como sendo anaeróbios estritos (MADIGAN, 1999). Contudo, a respiração de oxigênio por espécies de Desulfovibrio, um redutor de sulfato característico, foi relatado (ESCHEMANN, 1999; CYPIONKA, 2000). Nesse trabalho, os isolados caracterizados como redutores de sulfato não foram identificados, por não serem de interesse para aplicação em tecnologia MEOR, dado o seu envolvimento com problemas de corrosão (BEHLULGIL, 2002).

Os isolados LBBMA111A e 155 apresentam potencial para aplicação em tecnologia MEOR, dada a sua tolerância a temperaturas termofílicas e a elevadas concentrações de NaCl e a produção de biomassa em anaerobiose. Além disso, esses isolados são capazes de crescer em meios simples, utilizando uma fonte de carbono de baixo custo. Essas características têm sido apontadas como fundamentais para aplicação da tecnologia MEOR (JENNEMAN, 1985).

A maior tolerância ao NaCl em meio mineral não pode ser atribuída a um melhor ajuste osmótico nesse meio, em razão das diferenças de composição. Por apresentar composição mais simples que o meio E, e permitir crescimento adequado de microrganismos com características desejáveis para aplicação em MEOR, define-se o meio mineral como o mais apropriado em estudos com vistas à aplicação dessa tecnologia.

Grupo Jazida

O grupo denominado Jazida está constituído por um total de 54 isolados bacterianos obtidos a partir do isolamento de bactérias existentes nas amostras coletadas em jazidas de petróleo. Desses, 32 apresentaram crescimento em caldo nutriente quando incubados em anaerobiose a 50ºC (dados não apresentados).

A capacidade de crescimento anaeróbio em meios mineral ou E adicionados de 2 a 8% de NaCl foi constatada em 12 dos isolados (Tabela 4). Dentre este, nove apresentaram a característica de bactérias redutoras de sulfato quando inoculados em meio Postgate. Assim, apenas três isolados, os denominados LBBMA233, 260 e 270, foram considerados como potencialmente úteis para aplicação em MEOR nessa fase.

Os isolados do grupo Jazida que se mostraram incapazes de crescer em meio adicionado de NaCl, mesmo na concentração de 2%, provavelmente são alóctones e foram introduzidos juntamente com a água de injeção no processo de recuperação secundária ou durante outras etapas do processo de extração ou de coleta das amostras. As populações autóctones deveriam ser capazes de tolerar a presença de NaCl a pelo menos 2%.

A maioria dos isolados do grupo Jazida foi caracterizada como sendo de redutores de sulfato. Essa característica não é incomum entre microrganismos encontrados em jazidas marinhas, dada à abundância desse aceptor de elétrons na água de injeção (BEHLULGIL, 2002; JACK, 1989).

O isolamento e a seleção de bactérias da coleção do LBBMA para aplicação em tecnologia MEOR devem ser conduzidos, preferencialmente, a partir dos isolados originários de amostras coletadas das próprias jazidas, em razão da maior probabilidade de êxito. Assim, 5,5 % dos 54 isolados do Grupo Jazida (LBBMA233, 260 e 270) mostraram-se com potencial para essa aplicação, enquanto apenas 1% dos 190 isolados do Grupo REGAP/REDUC (LBBMA111A e 155), apresentaram as características desejáveis para aplicação em tecnologia MEOR.

Tabela 4: Crescimento microbiano de isolados do grupo Jazida em função da composição e da salinidade do meio. A incubação foi feita em condição aeróbia (Caldo Nutriente) ou anaeróbia (meio mineral e meio E), a 50ºC.

Isolado LBBMA Nº	Caldo Nutriente	Meio Mineral									Meio E									
		NaCl (%)																		
		2	3	4	5	6	7	8	9	12	2	3	4	5	6	7	8	9	12
233	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-			-	-
258	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
259	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
260	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
261	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
267	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
270	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
271	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
272	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
274	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
282	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
283	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Degradação ou tolerância ao petróleo

Os ensaios para avaliar a capacidade dos isolados redutores de nitrato, não redutores de sulfato, termófilos e halotolerantes dos grupos REGAP/REDUC (LBBMA155 e 111A) e jazida (LBBMA233, 260 e 270) de degradar petróleo revelaram que nenhum apresentou essa característica. Todos os isolados mostraram-se tolerantes à presença do petróleo, tendo como fonte de carbono o melaço (Figura 2).

Os cinco isolados selecionados não utilizam o petróleo como fonte de carbono em meio mineral na ausência de oxigênio, tendo o nitrato como aceptor de elétrons. Contudo, o petróleo não causa inibição do crescimento quando da presença de melaço como fonte de carbono (Figura 2). As taxas de crescimento e de degradação do petróleo por bactérias em condições anaeróbias, tendo o

nitrato como aceptor de elétrons, é reduzida ou inexistente (HEIDER, 1999; RABUS, 1996).

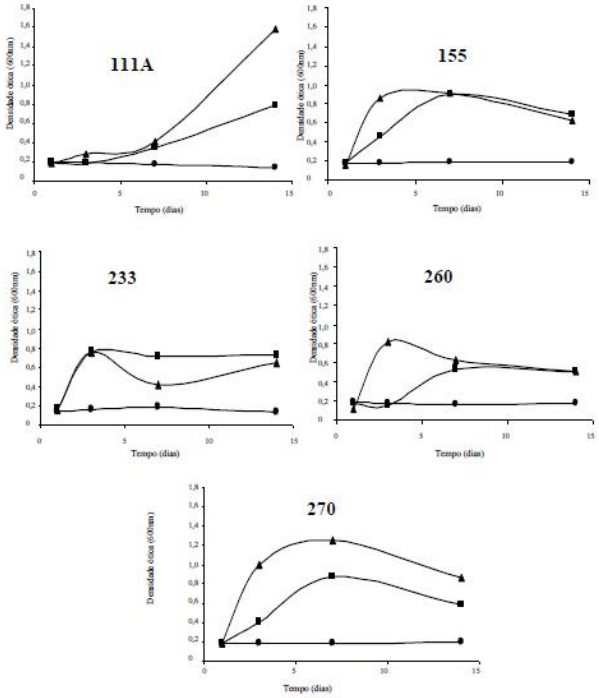


Figura 2: Crescimento dos isolados LBBMA111A, 155, 233, 260 e 270 em meio mineral acrescido de 1% (p/v) de petróleo (●), 1% (p/v) de petróleo e melaço (■) ou melaço (▲), em condições de anaerobiose a 50°C, por 14 dias.

Características metabólicas

Os isolados LBBMA155, 111A, 233, 260 e 270 não produziram ácido, gás ou biossurfactante nas condições testadas. No mesmo ensaio, foi constatada a produção de polímero extracelular nas culturas LBBMA155 e 270 mantidas em condições anaeróbias, desde o primeiro dia de incubação.

Os isolados LBBMA 155 e 270, ambos identificados como *Bacillus amyloliquefaciens*, são comprovadamente capazes de produzir biossurfactantes em condições aeróbias (BATISTA, 2000; LIMA, 2003). No entanto, nas condições anaeróbias empregadas neste trabalho, a produção de biossurfactantes não foi detectada. A produção de biossurfactantes em condições anaeróbias é uma característica reconhecidamente pouco comum (BICA, 1999).

Os isolados LBBMA 155 e 270 produzem muco em condições anaeróbias, uma característica desejável para a MEOR. O muco produzido reduz a permeabilidade da matriz rochosa (JENNEMAN, 1985; JANG, 1983). Em experimentos de laboratório, a injeção de cultura bacteriana de *Bacillus* promoveu a redução da permeabilidade de um sistema poroso (RAIDERS, 1986).

Isolados do gênero *Bacillus* têm mostrado características desejáveis para aplicação em MEOR, especialmente as espécies *B. licheniformes e B. subtilis* (YONEBAYASHI, 2000; RAIDERS, 1986). *B. licheniformes* TRC-18-2-a é um excelente produtor de biossurfactante, gás, ácido e polímero e *B. subtilis* TRC-4118 e TRC-4126 são produtores de biossurfactantes (YONEBAYASHI, 2000). O potencial de *B. licheniformis* BNP29 para aplicação em MEOR está relacionado à sua capacidade de produzir quantidades significativas de biomassa e polímero a 50ºC e salinidade entre 5 e 10% de NaCl (YAKIMOV, 1997). Ressalta-se que os trabalhos dos autores referidos foram conduzidos em condições aeróbias. Ao contrário, os resultados com o *B. amyloliquefaciens* LBBMA 155 e 270 foram obtidos em condições de anaerobiose, em experimento que retrata a condição predominante no interior das jazidas (FUSCONI, 1999).

CONCLUSÕES

O presente estudo objetivou selecionar microrganismos com potencial fisiológico para aplicação na tecnologia de recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos - MEOR.

De 244 isolados provenientes de amostras de solo ou sedimento, de água de lagoa aerada de refinaria, borra oleosa ou petróleo, cinco foram caracterizados como anaeróbios facultativos, não redutores de sulfato, capazes de crescer em meio mineral usando melaço como fonte de carbono, na presença de petróleo.

Os cinco isolados não produzem ácido, gás ou biossurfactante em anaerobiose quando cultivados em meio mineral adicionado de NaCl e melaço. Adicionalmente, não são capazes de degradar petróleo em meio mineral na ausência de oxigênio.

Dois isolados (LBBMA 155 e 270), *Bacillus amyloliquefaciens*, produzem exopolissacarídeos em anaerobiose, em meio mineral adicionado de melaço e de NaCl entre 2 e 7%. Dessa forma *Bacillus amyloliquefaciens* é mais uma espécie com grande potencial para aplicação em tecnologia MEOR. Concluímos por este ainda que a seleção de microrganismos a partir de amostras de jazidas de petróleo proporciona maior êxito na obtenção de isolados com características desejáveis para aplicação em tecnologia MEOR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. Redwood: Cummings Science, 1998. 694p.

BACHMANN, R.T.; JOHNSON, A.C.; EDYVEAN, R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.86, p.225-237, 2014.

BANAT, I.M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing Bacillus sp. **Biotechnology Letters**, v.15, n.6: p.591-594, 1993.

BATISTA, S.B. **Bactérias de ambientes contaminados com petróleo ou derivados produtoras de surfactantes e emulsificantes**. 2000. 77p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

BEHLULGIL, K.; MEHMETOGLU, M.T. Bacteria for improvement of oil recovery: A laboratory study. **Energy Source**, v.24, p.413-421, 2002.

BICA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading Rhodococcus ruber and Rhodococcus erythropolis. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.231-236, 1999.

BRYANT, R.S. Meor screening criteria fit 27% of U.S. oil reservoirs. **Oil & gas Journal**, v.5, p.56-58, 1991.

BRYANT, R.S.; BURCHFIELD, T.E.; DENNIS, D.M.et al. **Microbial enhanced waterflooding: a pilot study**. Proceedings of the 1992 International Conference on Microbial Enhanced Oil Recovery, v.39, p.289-306, 1993.

BUBELA, B. Geobiology and microbiologically enhanced oil recovery. Developments in petroleum science. **Microbial enhanced oil recovery**, v.22, p. 75-95, 1989.

CLARK, J.B.; MUNNECKE, D.M.; JENNEMAN, G.E. In situ microbial enhancement of oil recovery. **Developments in Industrial Microbiology**, v.22, p.695-701, 1981.

CLEMENT, T.P.; PEYTON, B. M.; SKEEN, R.S. et al. Microbial growth and transport in porous media under denitrification conditions: experiments and simulations. **Journal of Contaminant Hidrology**, v.24, p.269-285, 1997.

CLESCERL, L.S.; GREEBERG, A.E.; EATON, A.D. **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. 20.ed. America Public Health Association: New York, 1999. 524p.

CYPIONKA, H. Oxygen respiration by Desulfovibrio species. **Annual Review Microbiology**, v.54, p.827-848, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p. 350-356, 1956.

FUSCONI, R. **Aspectos metabólicos, fisiológicos e taxonômicos de actinomiceto produtor de exopolissacarídeos, provenientes de águas subterrâneas** (São Carlos) 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Curso de pós graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 1999.

GAO, P.K.; LI, G.Q.; ZHAO, L.X. et al. Dynamic processes of indigenous microorganisms from a low-temperature petroleum reservoir during nutrient stimulation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.117, n.2, p.215-221, 2014.

GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A. et al. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. American society for microbiology. Washington, D. C. 1994. 791p.

HEIDER, J.; SPORMANN, A.M.; SPORMANN, B. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22; p.459-473, 1999.

JACK, T.R.; SHAW, J.; WARDLAW, N. et al. Microbial plugging in enhanced oil recovery. Developments in petroleum science. **Microbial Enhanced Oil Recovery**, v. 22, p.125-149, 1989.

JANG, L.; CAHNG, P.W.; FINDLEY, J.E. et al. Selection of bacteria with favorable transport properties through porous rock for the application of microbial enhanced oil recovery. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n.5

p.1066-1072, 1983.

JENNEMAN, G. E. The potential for in situ microbial applications. Developments in petroleum science. **Microbial enhanced oil recovery**, v.22, p.37-69, 1989.

JENNEMAN, G.G.; MCINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M. Microbial penetration through nutrient- saturated berea sandstone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n.2, p.383-391, 1985.

KHIRE, J.M.; KHAN, M. I. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Importance and mechanism of MEOR. **Enzyme Microbiology Technology**, v.16, 1994.

KNAPP, R. M.; MCINENERNEY, M. J.; MENZIE, D. E. et al. **Microbial field pilot study**. Fossil Energy, 1993. LARPIN, S.; SAUVAGEOT, N.; PICHEREAU, V.et al. Biosynthesis of exopolysaccharide by Bacillus licheniformis strain isolated from ropy cider. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.1-9, 2002.

LIMA, T.M.S. **Produção de biossurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa**. Tese de Mestrado. 2003. 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2003.

MADIGAN, M.P. **Brock Biology of Microorganisms**. 9.ed. Southern Illinois University. Carbondale, 1999. 414p.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biorremediation of diesel oil contaminated alpine soils at low temperatures. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.47, p.462-468, 1997.

MCINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M.; CHISHOLM, J.L. et al. **Use of indigenous or injected microorganisms for enhanced oil recovery**. Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Canadá, 1999.

NAKANO, M.M.; DAILLY, Y.P.; ZUBER, P. et al. Characterization of anaerobic fermentative growth of Bacillus subtilis: Identification of fermentation end products and genes required for growth. **Journal of Bacteriology**, v.179, n. 21, p.6749-6755, 1997.

ODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R. Application of a modified drop-collapse technique for surfactante quantitation and screening of biosurfactant-producing. **Journal of Microbiological Methods**, v.32; p.273-280, 1998.

RABUS, R.; WIDDEL, F. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. **Applied and Environmental microbiology**, v.62, n.4, p.1238-1241, 1996.

RAIDERS, R.A.; MCINERNEY, M.J.; REVUS, D.E. et al. Selectivity and depth of microbial plugging in berea sandstone cores. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 1, p.195-203, 1986.

REASONER, D.J.; GELDREICH, E.E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.1, p.1-7, 1985.

SCHEMANN, A.; KUHL, M.; CYPIONKA, H. Aerotaxis in Desulfovibrio. **Environmental Microbiology**, v.1, n.6, p.489-494, 1999.

SPERL, P.L.; SPERL, G.T. New microorganisms and processes for MEOR. **Fossil Energy**, 1993.

STEPHENS, J.O.; BROWN, L.R.; VADIE, A.A. MEOR – A low cost solution for enhanced waterflood performance. **Fossil Energy**, 1999.

STEPHENS, J.O.; BROWN, L.R.; VADIE, A.A. The utilization of the microflora indigenous to and present in oil-bearing formations to selectively plug the more porous zones thereby increasing oil recovery during waterflooding. **Fossil Energy**. 2000.

TREBAU, G.L.; NUÑEZ, G.J.; CAIRA, R.L. et al. Microbial stimulation of lake maracaibo oil wells. **Society of Petroleum Engineers Journal**, v.7, p.45-52, 1999.

WANG, X.; XUE, Y.F.; XIE, S.H. Characteristic of enriched cultures and their application to MEOR field tests. Developments in petroleum science. **Microbial enhancement of oil recovery – Recent advances**, v.39, p.335-348, 1993.

YAKIMOV, M.M.; AMRO, M.M.; BOCK, M.L.et al. The potential of Bacillus lichenoformis strains for in situ enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and**

Engineering, v.18, p.147-160, 1997.

YONEBAYASHI, H.Y.; SHINICHIRO, O.K.; ENOMOTO, H. Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery processes. **Sekiyu Gakkaishi**, v. 43, n.1, p.59-69, 2000.