



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências da Biointeração
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

TATIANA OLIVEIRA DO VALE

Potencial de influência do surfactante lauril glicosídeo no metabolismo de BRS e suas implicações nos métodos terciários de recuperação de petróleo

Salvador-BA

2015

TATIANA OLIVEIRA DO VALE

Potencial de influência do surfactante lauril glicosídeo no
metabolismo de BRS e suas implicações nos métodos terciários de
recuperação de petróleo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal da Bahia, como requisito para obtenção
do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

**Salvador – BA
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA

V149 Vale, Tatiana Oliveira do.

Potencial de influência do surfactante lauril glicosídeo no metabolismo de BRS e suas implicações nos métodos terciários de recuperação de petróleo / Tatiana Oliveira do Vale. - Salvador, 2015.

65 f. ; il.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

1. Recuperação melhorada de petróleo. 2. Surfactantes. 3. Lauril glicosídeo. 4. Bactérias redutoras de sulfato. I. Chinalia, Fábio Alexandre. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 606

TATIANA OLIVEIRA DO VALE

**POTENCIAL DE INFLUÊNCIA DO SURFACTANTE LAURIL GLICOSÍDEO NO
METABOLISMO DE BRS E SUAS IMPLICAÇÕES NOS MÉTODOS TERCÍARIOS DE
RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 27 de novembro de 2015.

Fábio Alexandre Chinalia – Orientador _____
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,
U.ABERDEEN, Escócia
Universidade Federal da Bahia

Paulo Fernando de Almeida _____
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade de Campinas,
UNICAMP, Brasil
Universidade Federal da Bahia

Ícaro Thiago Andrade Moreira _____
Doutorado em Geologia Ambiental e dos Recursos Hídricos
UFBA, Brasil
UNIFACS, Brasil.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força concedida em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria e Carlos pelo carinho e dedicação, mas principalmente a minha mãe por ser um exemplo de determinação e perseverança. Aos meus irmãos pela confiança depositada. Aos meus sogros por todas as palavras de conforto e fé. A toda a minha família pelos conselhos e incentivos.

A meu noivo Thiago por todo o seu carinho, amor, respeito e amizade que tanto me ajudaram ao longo dessa trajetória.

Ao meu orientador Professor Doutor Fábio Chinalia pelos seus tão valiosos conselhos e orientação, uma contribuição muito além da área profissional, mas para toda a vida.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida pela credibilidade e por ter me recebido no LABEM.

Aos meus queridos e dedicados amigos do Laboratório Moura Costa, Larissa Fonseca, Mayara, Paulo, Bruno e Fabrícia pela ajuda em todos os momentos, em especial agradeço a Gabi por ter me ajudado a dar o primeiro passo na construção do meu trabalho e a Larissa Xavier por sua amizade que perdura pelos anos e laboratórios. A Fúlvia por sempre ser tão solícita e ter uma palavra de incentivo.

Com todo carinho e com muita gratidão a Sueli e Roberta, por todos os ensinamentos, por toda a paciência e muito mais pela amizade que sou muito grata e feliz em tê-la.

Aos funcionários, colegas e amigos do LABEM: Edmundo, Diego, Rose, Bethânia, Joalene, Leila, Jorge, Luiz, Adriana, Poliana, Flávia, Luana, Daniel, João, Luciana, Marcela, Pedro e a todos os outros colegas pelo apoio. Aos colegas e amigos dos outros laboratórios por toda ajuda.

A Jacson por todo seu auxílio nesse trabalho.

Aos amigos do mestrado Tino, Ércia e Ana por todos os momentos de alegria e companheirismo. E a todos os amigos que me ajudaram com seu carinho e incentivo.

À coordenação e a todos os funcionários do programa de Biotecnologia pelos direcionamentos.

Ao projeto 402822/2013-7 por ter financiado parte desse estudo.

A CAPES pela bolsa concedida.

VALE, Tatiana Oliveira do. Potencial de influência do surfactante lauril glicosídeo no metabolismo de BRS e suas implicações nos métodos terciários de recuperação de petróleo. 65 f. il.2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Mesmo após o emprego das técnicas secundárias de recuperação muito petróleo ainda se encontra retido nos reservatórios. Diante disso, métodos terciários (EOR) de recuperação veem sendo empregados, um deles é a inundação do reservatório com surfactantes. Nos reservatórios se encontram um grupo diverso de microrganismos, as bactérias redutoras de sulfato, que como resultado final do seu metabolismo produzem H_2S . Esse gás causa corrosão entre outros sérios prejuízos à indústria petrolífera. O objetivo desse trabalho, portanto, é o de avaliar a influencia do lauril glicosídeo em técnicas de EOR e o seu efeito na atividade metabólica das BRS. A cinética do consumo de sulfato foi usada como parâmetro de avaliação da atividade microbiana. A concentração micelar crítica do tensoativo foi aferida como sendo de aproximadamente 82ppm. Testes cinéticos foram realizados com diferentes razões de surfactante e petróleo (fontes de carbono) baseando-se no conceito do modelo de Monod. As variações de atividade de BRS (consumo de sulfato) corresponderam diretamente as concentrações iniciais de fontes de carbono. As respostas fisiológicas tanto de *D. vulgaris* quanto do consórcio de BRS isoladas de poço de petróleo produziram resultados no período de 12 horas. O maior consumo de sulfato ocorreu no intervalo de concentração do surfactante 0,14% para *D. vulgaris* e 0,21% para o consorcio de BRS. Altas concentrações do surfactante apresentaram efeito tóxico. *D. vulgaris* se mostrou mais sensível do que o consórcio de BRS. Testes em coluna de areia empacotada também foram realizados com o propósito duplo de (i) avaliar a taxa de recuperação do petróleo com uso do surfactante e, depois, (ii) estimar o efeito da água produzida contendo o surfactante na atividade de BRS. Os resultados sugerem que a atividade de BRS é significativamente afetada pelo surfactante, sendo que baixas concentrações ($\leq 2\%$) aumentam sua atividade (2 a 3 vezes a partir do controle sem o surfactante) e altas concentrações ($\geq 2\%$) tem efeito tóxico (zero consumo de sulfato). Portanto, para evitar alta produção de sulfeto por BRS durante o uso do surfactante na recuperação terciária de petróleo é necessário ajustar a dose para acima de 2%. Porem, caso ocorra uma diluição do surfactante pela matriz da formação rochosa, esse composto poderá ser utilizado pelas BRS como fonte de carbono e aumentar a produção de sulfeto. Esse fenômeno aconteceria quando as concentrações pontuais do surfactante sejam reduzidas para abaixo de 2%. Dessa forma, essa pesquisa destaca que, embora o uso de surfactante melhore a recuperação de petróleo, este pode aumentar significativamente a produção de sulfeto pelas BRS presentes no poço de petróleo.

Palavras-chave: recuperação melhorada de petróleo, surfactantes, lauril glicosídeo, bactérias redutoras de sulfato.

VALE, Tatiana Oliveira do. Surfactant influence potential lauryl glucoside in SRB metabolism and its implications for tertiary methods of oil recovery. 65 f. il.2015. Thesis (MS) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Even after the use of secondary recovery techniques much oil still trapped in the reservoirs. Therefore, tertiary methods (EOR) recovery see being employed, one is flooding the reservoir with surfactants. In reservoirs are a diverse group of microorganisms, sulfate reducing bacteria, that the final result of their metabolism produce H_2S . This gas causes corrosion and other serious damage to the oil industry. The aim of this study therefore is to evaluate the influence of lauryl glucoside in EOR techniques and its effect on the metabolic activity of SRB. The kinetics of sulfate consumption was used as the parameter of microbial activity. The critical micelle concentration of the surfactant was measured as being approximately 82ppm. Kinetic tests were conducted with different ratios of surfactant and oil (carbon sources) based on the concept model Monod. Variations of SRB activity (sulfate consumption) directly corresponded initial concentrations of carbon source. The physiological responses of both *D. vulgaris* as isolated SRB consortium of oil well produced results in 12 hours. The higher consumption of sulfate occurred in the surfactant concentration range 0.14% for *D. vulgaris* and 0.21% for the consortium of SRB. High surfactant concentrations had toxic effects. *D. vulgaris* was more sensitive than the SRB consortium. Tests packed sand column was also performed with the dual purpose of (i) assessing the oil recovery rate with use of the surfactant, and then (ii) estimating the effect of the produced water containing the surfactant in SRB activity. The results suggest that the SRB activity is significantly affected by surfactant, with low concentrations ($\leq 2\%$) increase their activity (2 to 3 times from the control without surfactant) and high concentrations ($\geq 2\%$) is toxic (zero consumption sulfate). Therefore, to avoid high production of sulfide by SRB for the use of surfactant in tertiary oil recovery it is necessary to adjust the dose to above 2%. However, in case of a dilution of the surfactant by the rock formation matrix, such a compound may be used by SRB as carbon source and increasing production sulfide. This phenomenon happens when the point of the surfactant concentrations are reduced to below 2%. Thus, this study points out that although the use of surfactants to improve oil recovery, this can significantly increase the production of sulfide by SRB present in the oil well.

Key – words: Enhanced Oil Recovery, surfactants, lauryl glucoside, sulfate - reducing bacteria.

LISTA DE ABREVIATURAS

APG – Alquil Poliglicosídeo

ASP – Alkali- Surfactante - Polimero

BRS – Bactérias redutoras de sulfato

BTEX - Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos

CEOR – Recuperação Melhorada de Petróleo Química

CMC – Concentração Micelar Crítica

CMI – Corrosão Microbiológica Induzida

CTAB – Brometo de Cetil Trimetil Amônio

EOR – Recuperação Melhorada de Petróleo

LABEM - Laboratório de biotecnologia e ecologia de microrganismos

MEOR - Recuperação melhorada de petróleo com microrganismos

OECD – Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento

RF – Fator de Recuperação

RPM - Rotação por minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TIF – Tensão interfacial

TS – Tensão superficial

VP – Volume do poro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01:	Esquema demonstrando as técnicas de EOR utilizadas nas indústrias petrolíferas.....	17
Figura 02:	Esquema representando a injeção de surfactantes no reservatório.....	19
Figura 03:	Estrutura de uma molécula de surfactante.....	20
Figura 04:	Esquema de formação de micelas.....	20
Figura 05:	Fluxograma descrevendo as etapas experimentais realizadas.....	26
Figura 06:	Estrutura química do composto lauryl glucoside.....	27
Figura 07:	Esquema representando núcleos porosos para simular o ambiente do reservatório. (A) Modelo de colunas sand-pack utiliza por Gudiña et al. (2013). (B) Colunas confeccionadas em PVC para esse estudo.....	31
Figura 08:	Esquema representando sistema para aquecimento e manutenção da temperatura para os experimentos com as colunas. (A) Foto mostrando o sistema fechado. (B) Foto mostrando o sistema aberto evidenciando uma das colunas em posição para o experimento.....	31
Figura 09:	Fluxograma descrevendo as etapas experimentais com as colunas de areia.....	33
Figura 10:	Variação da tensão superficial em diferentes concentrações de surfactante (ver TABELA1).....	35
Figura 11:	Gráfico de viscosidade do petróleo.....	36
Figura 12:	Variação do consumo do sulfato por <i>D. vulgaris</i> . Para facilitar o cálculo cinético e melhor visualizar o efeito da variação do surfactante as concentrações de sulfato foram transformadas em percentagem do valor inicial (Apêndice A). Os resultados correspondem a atividade do consumo de sulfato de <i>D. vulgaris</i> cultivada em meio mineral contendo petróleo (1,38%) e várias concentrações de surfactante (A) e o experimento controle contendo apenas as respectivas concentrações de surfactante (B). A concentração de surfactante em A e B são de (—) 0,03%, (---) 0,06%, (.....) 0,2%, (---) 0,5% e (---) 1,0%. Os resultados que não aparecem no gráfico B correspondem ao consumo zero, ou seja, concentrações	

tóxicas.....	38
Figura 13: Variação do consumo do sulfato por um consórcio de BRS isolado de poços de petróleo. Para facilitar o cálculo cinético e melhor visualizar o efeito da variação do surfactante as concentrações de sulfato foram transformadas em percentagem do valor inicial (Apêndice A). Os resultados correspondem a atividade do consumo de sulfato do consorcio de BRS em meio mineral contendo petróleo (1,38%) e várias concentrações de surfactante (A) e o experimento controle contendo apenas as respectivas concentrações de surfactante (B). As concentrações do surfactante foram: (—) 0,03%, (---) 0,06%, (.....) 0,2%, (---) 0,5% e (---) 1,0%. Os resultados que não aparecem nos gráficos correspondem ao consumo zero resultante da atividade tóxica do surfactante.....	39
Figura 14: Taxa do consumo de sulfato em diferentes concentrações da emulsão de petróleo com surfactante para <i>Desulfovibrio vulgaris</i> e (A) e para o consórcio de BRS isolado de poços de petróleo (B). A emulsão utilizada corresponde à concentração de 1,4% de petróleo (v/v) acompanhado por diferentes concentrações de surfactante (p/v). O modelo matemático utilizado para interpretar os dados foi a hipérbole single-retangular do programa SigmaPlot v11. Segundo os dados obtidos a partir do modelo matemático usado as concentrações nas quais ocorre o maior consumo de sulfato estariam entre 0,14 (R^2 0,61 e $p \geq 0,05$) para <i>D. vulgaris</i> e 0,21% (R^2 0,83 e $p \geq 0,05$) para o consórcio de BRS.....	44
Tabela 1: Variação dos valores do logaritmo Neperiano da concentração de surfactante em relação a sua tensão superficial que são utilizados para o cálculo da concentração micelar critica do lauril glicosídeo apresentado na Figura 10.....	34
Tabela 2 : Cinética do consumo de sulfato pela cepa <i>Desulfovibrio vulgaris</i> em meio mineral suplementado e não suplementado de 1,38% (v/v) de petróleo e sob as diferentes concentrações (p/v) de surfactante	40
Tabela 3: Cinética do consumo de sulfato pelo consórcio de BRS em meio mineral suplementado e não suplementado de 1,38% (v/v) de petróleo e sob as diferentes concentrações (p/v) de surfactante	41
Tabela 4: Valores de recuperação do petróleo.....	46
Tabela 5: Cinética de consumo de sulfato pelo consórcio bacteriano sob as diferentes diluições dos efluentes gerados a partir da operação das colunas de areia impregnadas com petróleo. As concentrações de sulfato em todos os tempos da cinética encontram-se no Apêndice B.....	48

Tabela 6: Cinética de consumo de sulfato pelo consórcio bacteriano sob as diferentes diluições dos efluentes controles gerados a partir da operação das colunas de areia. As concentrações de sulfato em todos os tempos da cinética encontram-se no Apêndice C.....

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO GERAL	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	RECUPERAÇÃO AVANÇADA OU MELHORADA DO PETRÓLEO.....	16
3.2	CEOR.....	18
3.3	SURFACTANTES.....	19
3.4	BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO.....	22
3.5	BRS E INDÚSTRIA PETROLÍFERA	24
3.6	SURFACTANTES E BRS.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ESQUEMA GERAL DE TRABALHO.....	26
4.2	SOBRE OS MICROORGANISMOS.....	27
4.3	SOBRE O SURFACTANTE	27
4.4	SOBRE O PETRÓLEO	27
4.5	MEIOS DE CULTURA E TESTES CINÉTICOS CONTROLE.....	28
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA(CMC)	29
4.7	DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA AS CINÉTICAS	29
4.8	QUANTIFICAÇÃO DO CONSUMO DE SULFATO	30
4.9	DESCRIÇÃO DOS TESTES EM COLUNA DE AREIA	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) DE LAURIL GLICOSÍDEO	34
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO PETRÓLEO.....	36
5.3	CÁLCULO DA TAXA DE CONSUMO DE SULFATO NOS TESTES CINÉTICOS COM <i>DESULFOVIBRIO VULGARIS</i> E COM O CONSÓRCIO DE BRS	37
5.4	COMPARANDO O CONSUMO DO SULFATO OBSERVADOS COM <i>DESULFOVIBRIO VULGARIS</i> E COM O CONSÓRCIO DE BRS	40
5.5	POTENCIAL USO DA EMULSÃO SURFACTANTE E PETRÓLEO COMO FONTES DE CARBONO PARA BRS	42
5.6	RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO E COLETA DE ÁGUA PRODUZIDA EM COLUNAS DE AREIA EMPACOTADA.....	44

5.7	CINÉTICA DE CONSUMO DO SULFATO NOS ENSAIOS COM ÁGUA PRODUZIDA DA RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO	47
6	CONCLUSÕES	51
7	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A	63
	APÊNDICE B	64
	APÊNDICE C	65

1 INTRODUÇÃO

O petróleo continua sendo o principal componente da matriz energética mundial e, diante das dificuldades de se encontrar novos poços, mais técnicas são desenvolvidas ou aprimoradas com o objetivo de melhorar ou aumentar a recuperação do óleo contido nos reservatórios maduros (BACHMANN et al., 2014; BABADAGLI, 2007; MUGGERIDGE et al., 2014).

Após o processo de extração primária, muito óleo ainda se encontra retido nos poços (GUDIÑA et al., 2012; 2013). O resgate deste óleo residual é realizado através de técnicas de recuperação secundária ou, terciária (do inglês EOR), que pode até utilizar microrganismos ou seus produtos (do inglês MEOR) (BANAT, 1994; LAZAR et al., 2007; MARCHANT e BANAT, 2012; SEN, 2008). A recuperação secundária consiste na injeção de um fluido (geralmente água do mar) para restaurar a pressão interna, contudo, a produção eventualmente cai e a recuperação terciária é aplicada. Têm-se como exemplos de EOR a injeção de água com produtos químicos, como surfactantes e outros polímeros, injeção de vapor, ou combustão *in situ* (BRONW, 2010; GUDIÑA et al., 2013).

A adição de surfactante pode aumentar a recuperação de petróleo de quatro maneiras (DREW, 2006 apud KO et al., 2014), são eles:

- (i) Diminuição da tensão interfacial entre a solução de água óleo no reservatório;
- (ii) Emulsificação ou microemulsificação do óleo aprisionado;
- (iii) Redução das propriedades reológicas interfaciais da interface óleo-água e
- (iv) Controle da molhabilidade nos poros da rocha otimizando o escoamento do petróleo.

Devido as suas propriedades os surfactantes têm sido empregados na recuperação de óleo por grandes empresas petrolíferas, apresentando bom desempenho nesta função (ENHANCED OIL RECOVERY, 2012).

Surfactantes são substâncias, que apresentam poder de detergência, molhabilidade e de formação de espuma (MULLIGAN, 2005). Embora essas moléculas têm sido empregadas na indústria petrolífera durante décadas (IGLAUER et al., 2010), não se sabe ao certo qual sua ação na microbiota existente nos poços. Acredita-se que sua ação possa ser resumida em dois processos específicos:

- (i) Estimulação da atividade microbiana por ser uma fonte adicional de carbono, ou;
- (ii) Apresenta efeito tóxico para a atividade microbiana por agir diretamente na estrutura da membrana celular e solubilização de compostos tóxicos.

É possível que as duas ações antagônicas possam ocorrer no ambiente dependendo da concentração de surfactante presente. Portanto, em concentrações altas, a presença de surfactante pode inibir a atividade microbiana, mas, em concentrações baixas podem estimulá-la. Dessa forma, a adição de surfactante nos fluidos de injeção pode ser utilizada para controlar a atividade microbiana.

As Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) são organismos anaeróbios presentes nos reservatórios, que geram muitos problemas e preocupação para a indústria do petróleo. Esse grupo de organismos é capaz de produzir grandes quantidades de sulfeto de hidrogênio que geram fenômenos deletérios como o “souring” (acidificação do petróleo) (BEECH e SUNNER, 2004; BHAGOBATY, 2014). As BRS necessitam de condições simples para o crescimento, requerendo apenas como fonte de energia carbono orgânico simples, incluindo derivados de petróleo, e sulfato comoceptor de elétrons (SEN, 2008). A introdução dos surfactantes promove a solubilidade de componentes hidrofóbicos na água aumentando a biodisponibilidade desses compostos (COOPER, 1986 apud ISMAIL et al., 2013; KACZOREK et al., 2010). Contudo, estudos sobre o efeito de surfactantes usados na recuperação de petróleo na atividade bacteriana das BRS são escassos.

A hipótese levantada neste estudo é que, em algumas condições, o uso de surfactantes para aumentar a recuperação de petróleo pode contribuir para o aumento e/ou manutenção das populações das BRS nos reservatórios maduros. Esse fato pode ter significativa consequência para a qualidade do óleo extraído e para a manutenção do equipamento, uma vez que essas bactérias comumente causam o “souring”. É necessário quantificar o potencial efeito da adição de surfactante em amostras ambientais no metabolismo de BRS para assim descobrir as melhores condições e ou concentrações para seu uso. Ressaltando ainda que em altas concentrações essas mesmas substâncias que podem ser utilizadas como fonte de carbono pelas BRS podem, também, ser tóxicas. Portanto, aprimorar o conhecimento a respeito desses tensoativos e sua ação sobre o metabolismo das bactérias presentes nos reservatórios é importante para o desenvolvimento de melhores métodos de recuperação do petróleo em campos maduros.

2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência do surfactante lauril glicosídeo nas respostas fisiológicas de BRS comumente presentes em reservatórios de petróleo em condições de recuperação terciária.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Caracterizar o surfactante lauril glicosídeo (determinação da Concentração Micelar Crítica – CMC);

- Caracterizar a cinética do consumo de sulfato das BRS em diferentes concentrações de surfactante, na presença de petróleo e seus respectivos controles;

- Simular o processo de recuperação terciária usando lauril glicosídeo em testes com colunas de areia empacotada;

-Caracterizar a cinética do consumo de sulfato das BRS na presença dos efluentes (água produzida) gerados na simulação de recuperação terciária (diluídos).

- Contribuir para a metodologia de recuperação melhorada de petróleo através da determinação da concentração de surfactante e seu provável efeito na produção de H₂S na formação rochosa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RECUPERAÇÃO AVANÇADA OU MELHORADA DO PETRÓLEO

Os combustíveis fósseis continuam sendo a principal fonte de energia do mundo (WEI et al., 2005). A sua demanda aumenta consideravelmente ao longo dos anos, graças aos grandes países consumidores e aos que estão em desenvolvimento (GHARBI et al., 2012). A previsão de consumo para os países pertencentes e não pertencentes à OECD (Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento até 2030 é de 15.5-73%, respectivamente (BACHMANN et al., 2014).

Responder a essa demanda mundial é um grande desafio para indústria petrolífera. Para isso existem duas possibilidades a serem exploradas, sendo a primeira a descoberta de novos campos e a segunda consiste na elevação das taxas de recuperação. Em relação a primeira opção, as desvantagens econômicas e ambientais são grandes, uma vez que, as bacias ainda não exploradas estão em regiões remotas e ambientalmente sensíveis, como a Antártica e o Ártico (MUGGERIDGE et al., 2014).

Recentes estratégias de recuperação de petróleo desenvolveram-se a partir das dificuldades de se encontrar novos campos e o fato de a maioria dos grandes reservatórios já se encontrarem em estado maduro de exploração (BABADAGLI, 2007; SANDREA e SANDREA, 2007).

Na recuperação primária a produção de óleo e gás é feita utilizando a pressão natural do poço, com o passar do tempo essa pressão é dissipada e sua restauração é feita através da injeção de fluídos, sendo geralmente água do mar (recuperação secundária). Nesses dois processos cerca de 5-50% podem ser recuperados restando ainda uma grande quantidade de óleo. Essa baixa taxa de recuperação se dá principalmente devido a alta viscosidade do óleo residual, e elevada tensão superficial entre a fase água-óleo (GUDIÑA et al., 2012; 2013; YE et al., 2014).

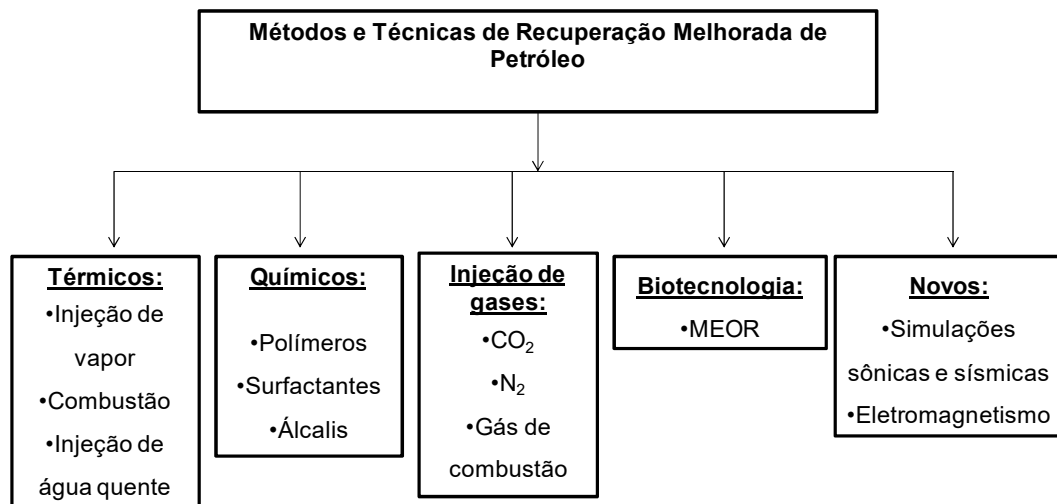
Há uma grande preocupação por parte das companhias petrolíferas em elevar as taxas de recuperação do petróleo, uma vez que, a descoberta de novas fontes é cada vez mais difícil e o fator de recuperação (RF) atual não poderá responder ao requerimento futuro (ALVARADO e MANRIQUE, 2010). Diante disso, cresce o interesse pelas técnicas de recuperação melhorada (EOR). EOR trata-se do estágio de produção de hidrocarbonetos que envolve o uso de técnicas sofisticadas para recuperar mais petróleo do que seria possível utilizando apenas a produção primária ou secundária. Além disso, EOR engloba uma

variedade de técnicas utilizadas para restaurar a pressão da formação e melhorar deslocamento hidrocarboneto ou fluxo do fluido no reservatório (OILFIELD GLOSSARY, 2015; HOWE et al., 2015; TERRY, 2001).

Os fatores citados influenciam diretamente no preço do óleo e estimula consideravelmente a utilização de processos de EOR. De acordo com Terry (2001) a produção de petróleo pode ser de 3 bilhões de barris empregando esses métodos. As possibilidades futuras promovem o desenvolvimento de novos estudos e projetos relacionados a técnicas de EOR. São mais de 600 projetos descritos na literatura (ADASANI e BAI, 2011).

A maior parte dos métodos de EOR hoje usados foram propostos primeiramente na década de 60, em um momento de altos preços (HOWE et al., 2015; MUGGERIDGE et al., 2014). E atualmente estão sendo bem empregados em todo o mundo inclusive no Brasil (ALVARADO e MANRIQUE, 2010). Dados revelam que dos 650 bilhões de barris produzidos pelos EUA, a maioria corresponde ao uso de técnicas de EOR (SEN, 2008). A figura abaixo (FIGURA 1) representa os métodos usados pelas indústrias.

Figura 1. Esquema demonstrando as técnicas e EOR utilizadas nas indústrias petrolíferas.



Fonte: Adaptado de Sen, 2008.

Os métodos de EOR são classificados de acordo com os processos e substâncias que utilizam. Os processos térmicos referem-se à injeção de água, vapor quente ou a combustão *in situ*, são técnicas aplicadas geralmente em reservatórios contendo óleos crus pesados. As inundações com miscíveis são realizadas com a introdução de gases como, por exemplo, CO₂, N₂ em um único ou em múltiplos contatos, são mais usados em poços com óleos mais leves.

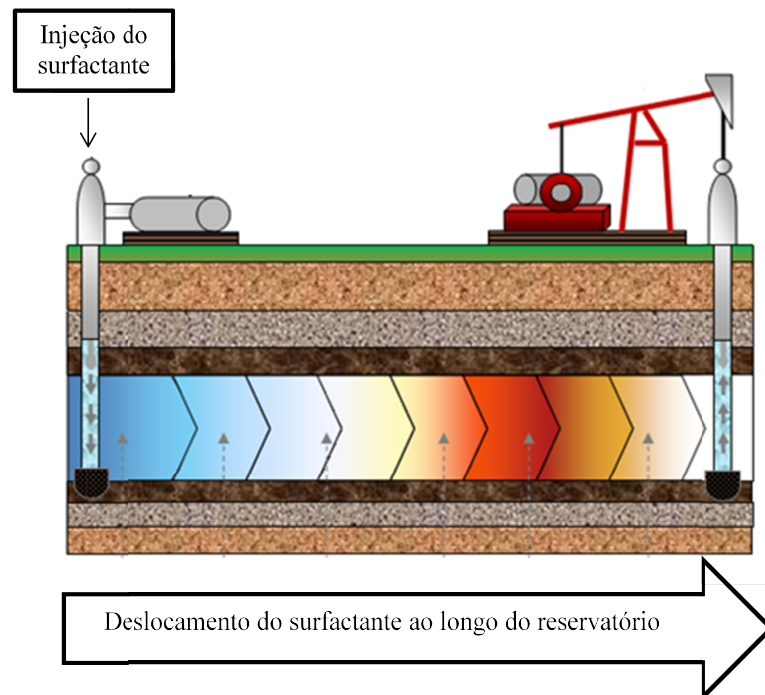
Mas, atualmente novos métodos estão sendo implantados como é o caso da aplicação de microrganismos e seus produtos no poço, do aquecimento do óleo por eletromagnetismo, além de tratamentos ultrassônicos (ABRAMOV et al., 2014; TERRY, 2001).

3.2 CEOR

Os processos químicos são também chamados em inglês de “*Chemical Enhanced Oil Recovery*” (CEOR). Esses procedimentos usufruem do uso de surfactantes, polímeros, ácidos, gases, sais e solventes convencionais a fim de promover a recuperação de óleo não recuperado de reservatórios maduros, cerca de 30% do óleo pode ser recuperado através dessa tecnologia, sendo que as expectativas são de elevação dessa taxa em até 80% (PEREIRA et al., 2014; SANDREA e SANDREA, 2007). Atualmente as técnicas de CEOR têm ganhado notoriedade graças aos avanços tecnológicos e a possibilidade de testes em campos (JANG et al., 2015; LOTFOLLAHI et al., 2015).

A inundação do poço com surfactante é uma técnica de CEOR bastante empregada, uma vez que, os tensoativos conseguem diminuir a tensão interfacial fazendo o óleo aprisionado nos poros da rocha ser deslocado (SANDERSEN, 2012). A recuperação do óleo é consideravelmente melhorada com o emprego dos surfactantes, a partir de quatro mecanismos principais: grande diminuição da TIF (tensão interfacial) entre o óleo e a água, micro e macroemulsificações entre água-surfactante-óleo, alteração das propriedades reológicas, como, diminuição da viscosidade e controle da molhabilidade (DREW, 2006 apud KO et al., 2014). O processo de injeção de surfactantes no poço está representado pelo esquema da FIGURA 2.

Figura 2. Esquema representando a injeção de surfactantes no reservatório.



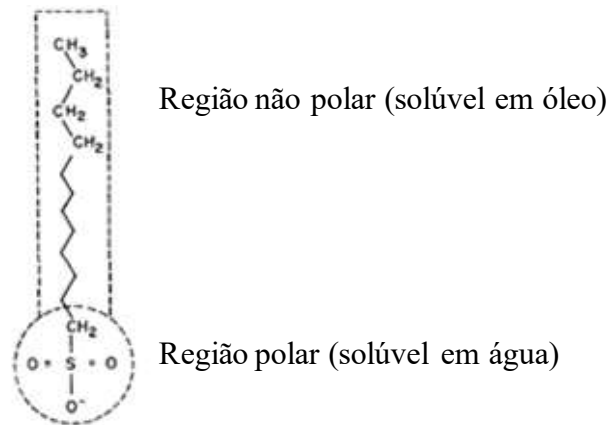
Fonte: Adaptado de Sandersen, 2012.

São amplas e bem diversas as aplicações dessas moléculas na indústria do petróleo, são usados desde a perfuração do poço, aos processos de produção inicial, processamento e recuperação, nos oleodutos e durante o transporte de reservas situadas no mar (SCHRAMM e MARANGONI, 2000).

3.3 SURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfífilas que reduzem a energia livre do sistema substituindo as moléculas de maior energia em massa numa interface. Apresentam duas porções, uma região hidrofóbica com baixa afinidade para o solvente e outra porção hidrofílica com grande afinidade com o solvente (FIGURA 3). Possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. A tensão superficial é definida como a entalpia livre da superfície por unidade de área, sendo a força que age na superfície do líquido minimizando a área de superfície. Um bom surfactante consegue diminuir a tensão superficial da água de 72 para 35mN/m e a tensão interfacial (tensão entre as fases não-polar e polar) de 40 para 1mN/m. (ARAJI et al., 2007; DESAI e BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005).

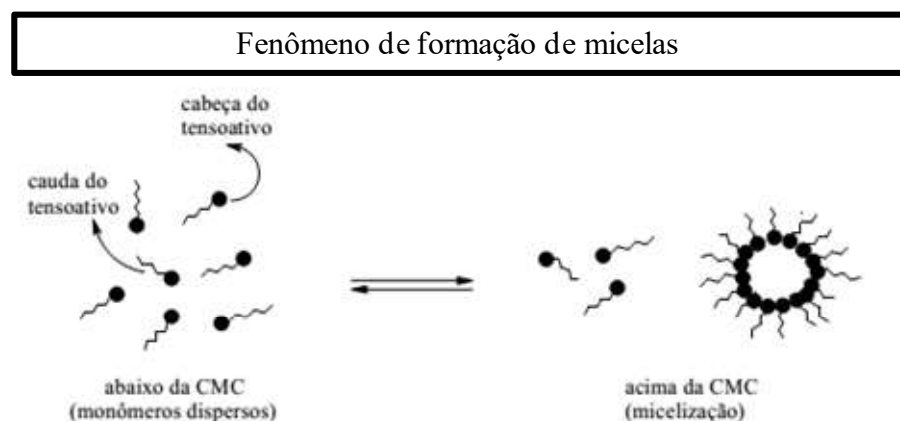
Figura 3. Estrutura de uma molécula de surfactante



Fonte: Adaptado de Sharma e Shah, 1989.

Essas características são dadas através de um processo de remanejamento molecular que afeta as interações (hidrofóbicas – hidrofílicas) químicas presentes (COLLA e COSTA, 2003; PRAZERES et al., 2012). Em dadas concentrações os surfactantes assumem o comportamento de formação de micelas (FIGURA 4). Os monômeros antes dispersos e desordenados se orientam formando essas estruturas micelares com núcleo hidrofóbico. O aumento dessas estruturas leva a redução da tensão superficial e interfacial (LAU et al., 2014). A concentração onde esse fenômeno começa ocorrer é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC) (BERA et al., 2011).

Figura 4. Esquema de formação de micelas.



Fonte: Adaptado de Rossi et al., 2006.

Logo, determinar a CMC do surfactante é um parâmetro importante para definir a quantidade necessária do tensoativo para alterar as propriedades de tensão superficial e interfacial do sistema de interesse. Além disso, valores acima dessa concentração apresentam uma pequena diminuição na tensão superficial (BERA et al., 2011; GHARBI et al., 2012; LUNA et al. 2008; SHEPPARD e MULLIGAN, 1987; TIEHM, 1994).

Os surfactantes são classificados de acordo a natureza iônica da sua porção hidrofílica, nos seguintes grupos (KESSEL, 1989; MULLIGAN, YONG e GIBBS, 2001; ROSSI et al., 2006, SWADESI et al., 2015):

- Iônicos (apresentam carga elétrica na porção hidrofílica), nesse caso podem ser catiônicos (ex. sais quaternários de amônio, Brometo de cetil trimetil amônio-CTAB, Hidrocloreto de dodecilamina) ou aniônicos (ex. sulfonatos de petróleo, sulfatos sintéticos e carboxilatos, Dodecil sulfato de sódio (SDS), Dodecil benzeno sulfonato de sódio);
- Não-iônicos:são aqueles que em dissolução na água não liberam cargas elétricas (ex. Alquil-aril-éter poliglicólico, óxido polietileno);
- Zwitteriônicos (podem apresentar tanto cargas negativas quanto positivas) também chamados anfóteros (ex. betaína, aminóxidos).

Devido as suas propriedades os surfactantes apresentam uma ampla gama de aplicações (SINGH et al. 2007). Sendo principalmente utilizado nas indústrias farmacêuticas, têxtil, produtoras de papel, cosmética, do petróleo e alimentícia (como emulsificantes), além da fabricação de produtos de limpeza e na biorremediação (GAO et al., 2007; MAKKAR e ROCKNE, 2003; MULLIGAN, YONG e GIBBS, 2001; VOLKERING et al., 1998). Acredita-se que mais de 10 milhões de toneladas sejam produzidas por ano e com perspectivas de aumento (DESAI e BANAT, 1997; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; MARCHANT e BANAT, 2012; VAN BOGAERT et al., 2007).

O interesse no uso de surfactantes é grande graças ao seu potencial para uso aplicado. Na indústria de petróleo são utilizados a décadas, sendo a primeira patente depositada em 1927 (KESSEL, 1989). Estudos recentes buscam a criação de novos tipos de surfactantes que suportem as condições adversas do poço, que sejam cada vez menos adsorvidos pelas rochas do reservatório e mais eficientes na recuperação do óleo (AHMADI e SHADIZADEH, 2013; CURBELO et al., 2007; GAO e SHARMA, 2013; IGLAUER et al., 2010; LOTFOLLAHI et al., 2015; LU et al., 2014; SHAMSIJAZEYI et al., 2014; 2014). Os surfactantes estão

novamente ganhando mais visibilidade dentre os métodos de CEOR, já que os avanços científicos permitem o desenvolvimento dos meios de utilização dessa técnica na recuperação do petróleo (KAMAL, SULTAN e HUSSEIN, 2015; KARAMBEIGI et al., 2015). As chamadas microemulsões são um novo passo para elevar a recuperação do óleo empregando surfactantes, assim como, consórcios com soluções alcalinas e outros polímeros, como por exemplo, as misturas ASP (*Alkali-Surfactant-Polymer*) (ALVARADO e MANRIQUE, 2011; BERA et al., 2011; DELSHAD et al., 2013; DONG et al., 2009; KAYALI et al., 2010; KAZEMPOUR et al., 2013; LI et al., 2009; LIU et al., 2007; SANTANNA et al., 2009; WU et al. 2014).

Geralmente a porção hidrofóbica dos surfactantes consiste em uma cadeia de ácido graxo. É sabido que essa região pode ser degradada por bactérias e utilizada como fonte de carbono (CHRZANOWSKI et al., 2012; MAKKAR e ROCKNE, 2003). Além de serem usados como fonte de carbono, essas moléculas são capazes de alterar as propriedades do óleo através da quebra de longas cadeias em outras menores (ETOUMI, 2007; 2008), ou seja, aumentam a biodisponibilidade desses componentes (COOPER, 1986 apud ISMAIL et al., 2013; KACZOREK et al., 2010). No entanto, esse fenômeno que é tão importante para a biorremediação, pode não ter um efeito tão desejável quando se trata de recuperação do petróleo, isso devido a presença das BRS que podem se beneficiar utilizando esses hidrocarbonetos e os próprios surfactantes como fontes extras de carbono.

3.4 BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO

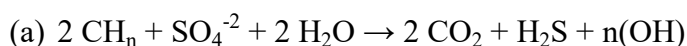
As Bactérias Redutoras de Sulfato ou BRS são um grupo especializado de micróbios anaeróbios que utilizam sulfato como aceptor final de elétrons no processo de respiração. São capazes de suportar situações extremas, de temperatura, de taxa de salinidade e pressão. São encontradas virtualmente em todos os ambientes anaeróbios pesquisados (OLLIVIER e MAGOT, 2005; POSTGATE, 1965). Formam um complexo grupo ecofisiológico de procariotos, com grande flexibilidade metabólica (PLUGGE et al., 2011; RUBIO et al., 2006).

Consistem em um grupo bastante diverso, com mais de 200 espécies descritas. Apresentam importantes papéis ambientais, como no ciclo do enxofre, na regulação de vários processos, como, o volume da matéria orgânica, biodegradação de poluentes aromáticos em solos, metilação de mercúrio e no tratamento de águas residuais (CASTRO et al., 2000; COMPEAU e BARTHA, 1985; HAO et al., 2014). Contudo, para indústria do petróleo esses microrganismos não favorecem de forma alguma na produção.

São comumente encontradas nos reservatórios, todavia, sua origem nos poços é discutível, não se sabe ao certo se fazem parte da microbiota endógena ou se foram introduzidos junto com a injeção de água na recuperação secundária (BENKA-COKER et al., 1995; BEYERINCK, 1895 apud VOORDOUW et al., 1996). No entanto, devido a grande diversidade encontrada nos reservatórios a hipótese de serem organismos endógenos está sendo mais aceita (OLLIVIER e MAGOT, 2005). Os primeiros registros de BRS foram feitos a mais de 100 anos (VOORDOUW, 1995) e ainda hoje despertam interesse, principalmente devido aos produtos gerados a partir do seu metabolismo.

As BRS são heterotróficas e usam uma ampla gama de compostos como fonte de carbono, por exemplo, ácidos monocarboxílicos tais como, acetato, propionato, butirato, formiato, lactato e piruvato, dicarboxílicos como, malato fumarato, succinato, alguns alcoóis, etanol, metanol, 1 e 2-propanol, 1-butanol e glicerol, acetaldeído. Podem também usar aminoácidos, furfural, nitrogênio metilado, componentes de enxofre, hidrocarbonetos aromáticos e saturados (HAMILTON, 1983; TANG, BASKARAN e NEMATI, 2009). São encontradas tanto em poços rasos como em jazidas profundas. Além disso, são altamente resistentes podendo suportar período prolongado de escassez de nutrientes, nessa situação diminuem de tamanho e quando a inundação de água ocorre elas conseguem percorrer longas distancias proliferando em novas regiões, quando se encontram neste quadro são pouco afetadas pelos biocidas (SEN, 2008). Obtêm energia através da oxidação de compostos orgânicos ou hidrogênio molecular, reduzindo sulfato a sulfeto de hidrogênio em condições anaeróbias, como mostrado na Equação 1 (a). A Equação 1 (b) exemplifica a reação estequiométrica específica para o consumo de gliceraldeído por BRS.

Equação 1: Formula estequiométrica que resume os metabolismos de bactérias redutoras de sulfato (Baseado em HAN; ZHANG; XU, 2011 e SHERRY et al., 2013)



O processo cinético de redução do sulfato tem sido extensivamente estudado. É uma variável importante de avaliação do metabolismo de BRS. Basicamente as BRS necessitam de condições simples para o crescimento, requerendo apenas como fonte de energia e o sulfato (SEN, 2008). Durante o processo de recuperação secundária por injeção de água marinha pode acontecer um significativo aumento desses organismos uma vez que essa água contém grandes quantidades de sulfato (AGRAWAL et al., 2010).

3.5 BRS E A INDÚSTRIA PETROLÍFERA

Em 1926, foi pela primeira vez sugerido que o sulfeto presente na água retirada dos poços era de origem microbiológica (BASTIN et al., 1926 apud OLLIVIER e MAGOT, 2005). Atualmente as BRS constituem o grupo de organismos de maior importância para a indústria mundial do petróleo (KAUR et al., 2009). A produção do sulfeto de hidrogênio biogênico provoca graves problemas ambientais, é tóxico para a biota, afetando profundamente suas funções fisiológicas quando presente em elevadas concentrações (TANJI et al., 2014). Os produtos gerados a partir do metabolismo microbiano, em suma o H₂S gera uma grande quantidade de prejuízos ambientais e econômicos para as grandes companhias (BHAGOBATY, 2014; KAUR et al., 2009; LUNA et al., 2008).

Essas bactérias são comumente as responsáveis pelo fenômeno conhecido como “souring”, CMI (corrosão microbiológica induzida) em todas as etapas do processo (BERNADEZ, LIMA e ALMEIDA, 2007; TANG, BASKARAN e NEMATY, 2009). A sua toxicidade ainda ameaça a segurança dos operadores, uma vez que, a exposição a baixas concentrações (10ppm) já pode causar estresse físico e concentrações de 250ppm podem levar a morte (QI, ZHANG e WAN, 2014). Cerca de 100 milhões de dólares são gastos na tentativa de reparar os prejuízos causados pelas BRS (BHAGOBATY, 2014). Diante disso, cada vez mais trabalhos buscam meios de inibir o crescimento microbiano e a produção de H₂S biogênico, além dos outros processos deletérios (ALMEIDA ET AL., 2006; BEECH e SUNNER, 2004; CIRNE et al., 2008; EL-SHESHTAWY et al., 2015; KAUR et al., 2009; NEMATY et al., 2001; TANJI et al., 2014; VIDELA, 2002; WEI et al. 2010).

3.6 SURFACTANTES E BRS

Os surfactantes podem ser utilizados de duas maneiras básicas em relação a atividade metabólica de BRS:

- (i) Estimulam a atividade metabólica (baixas concentrações)
- (ii) Inibem a atividade metabólica (altas concentrações)

Os intervalos de concentrações que os surfactantes podem estimular a atividade microbiana, ainda não está definido em literatura. Sabe-se que em certas concentrações os surfactantes podem ser utilizados como fonte de carbono ou mesmo auxiliar na utilização de outros compostos orgânicos. Por exemplo, os surfactantes são utilizados para intensificar o processo de biodegradação e biorremediação por auxiliar na solubilização dos componentes

hidrofóbicos na água. Portanto, essa substância favorece a biodegradação microbiana graças ao aumento da biodisponibilidade desses componentes (COOPER, 1986 apud ISMAIL et al., 2013; KACZOREK et al., 2010). Todavia, assim como podem contribuir para esse processo podem, em concentrações altas, ser tóxicos para os organismos (VOLKERING et al., 1998). No entanto, o intervalo de concentração a partir do qual os surfactantes apresentam ações tóxicas não está claro em literatura.

É fato que as grandes companhias usam soluções contendo surfactantes na tentativa de aumentar as taxas de recuperação do óleo aprisionado na formação rochosa. Sabe-se também que muitos surfactantes podem apresentar efeitos tóxicos as bactérias. Por esse motivo, as empresas utilizam essa substância na tentativa de diminuir ou mesmo eliminar os efeitos nocivos causados pelas bactérias redutoras de sulfato. Porém, como foi citado, padrões de toxicidade e estimulação dos surfactantes nas BRS não estão bem esclarecidos. Luna et al. (2008) avaliou o efeito de quatro diferentes tensoativos na quantificação das BRS, em seu trabalho revela respostas tanto estimulatórias em relação a adição de surfactantes em amostras com óleo como possíveis respostas inibitórias.

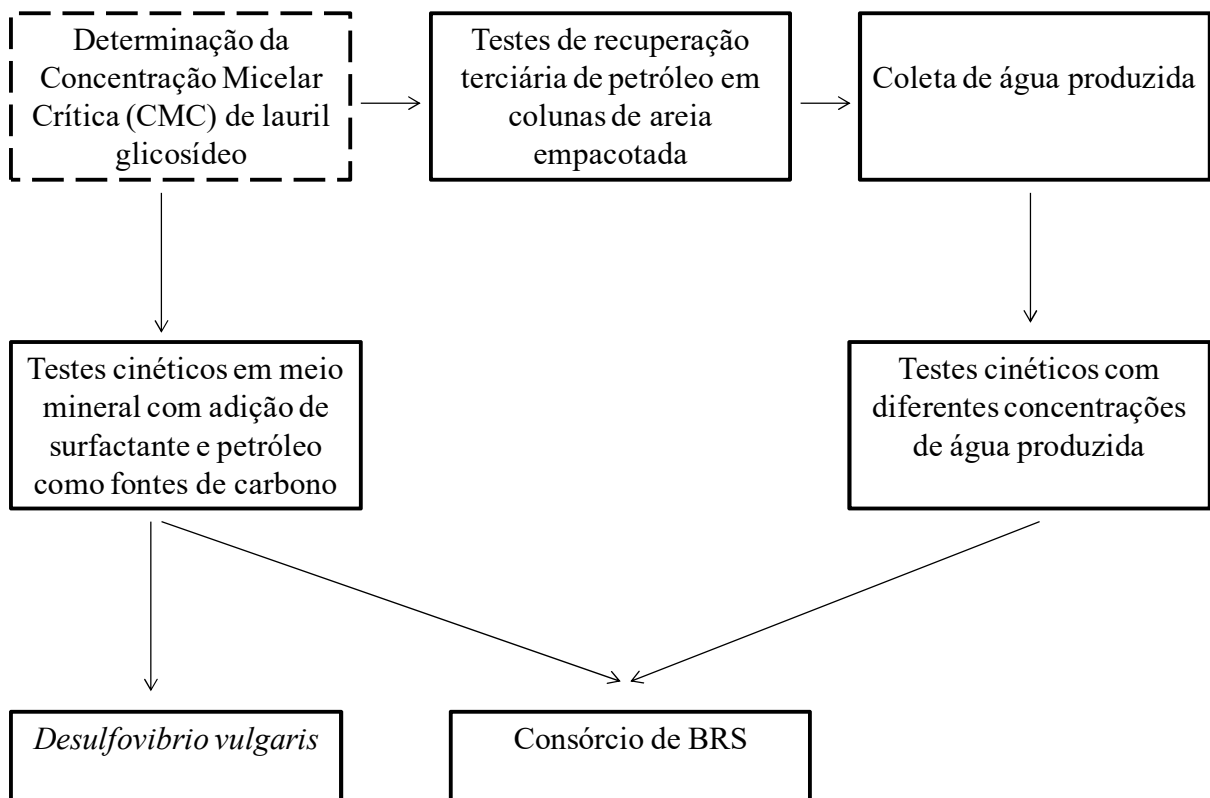
Padrões de toxicidade também podem ser evidenciados com a aplicação de surfactantes, até mesmo compensando o processo de biodisponibilização. Os mecanismos de ação desses compostos incluem a desestabilização de membranas celulares e até mesmo inibição da atividade de enzimas essenciais ao funcionamento do microrganismo (CSERHÁTI, FORGÁCS, OROS, 2002; SONG e BIELEFELDT, 2012). Esse aspecto pode ser positivamente explorado pelas indústrias do petróleo, uma vez que a injeção de determinadas concentrações de tensoativos pode apresentar efeito tóxico ao BRS e assim haver controle da produção de H₂S. Até o momento, no entanto, são poucos os trabalhos referentes ao efeito do uso de surfactantes na microbiota nos campos de petróleo. A influência dessas substâncias nas respostas fisiológicas desses microrganismos não é bem conhecida. Logo se faz necessários estudos que busquem avaliar a influência dessa substância sobre o crescimento microbiano e possam guiar melhores estratégias de controle desses organismos, diminuindo dessa forma, os prejuízos econômicos causados a indústria petrolífera pelas BRS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESQUEMA GERAL DO TRABALHO

Para atingir o objetivo de avaliar o potencial do surfactante como fonte de carbono para o crescimento de BRS foi gerado um planejamento experimental representado na Figura 5. Os testes cinéticos foram realizados tanto com a cepa *Desulfovibrio vulgaris* (modelo de estudos com BRS) quanto com um consórcio de BRS isoladas de poços maduros. O meio mineral sintético foi suplementado com diferentes concentrações do surfactante lauril glicosídeo e com petróleo, testes de controle contendo meio suplementado apenas com surfactante também foram realizados. Além disso, um processo terciário de recuperação foi simulado em colunas de areia empacotada e a água produzida foi coletada e também usada em testes cinéticos, nesse caso em diferentes concentrações (diluições) visando identificar as respostas do consórcio de BRS em emulsões de óleo/água/surfactante.

Figura 5. Fluxograma descrevendo as etapas experimentais realizadas



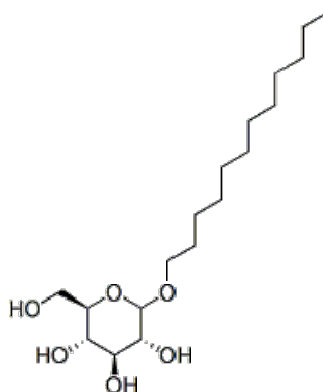
4.2 SOBRE OS MICRORGANISMOS

O consórcio bacteriano usado nos experimentos foi obtido a partir da água produzida proveniente de poços localizados na Bacia do Recôncavo Baiano, sendo isolado e mantido em meio Postgate modificado (ver item 4.5). Além do consórcio, a cepa *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579 adquiridas no ATCC *Bacteriology Collection* e atualmente pertencente a coleção de cultura do LABEM (Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos) foi utilizada como método de comparação, pois, é um modelo fisiológico para estudos com BRS.

4.3 SOBRE O SURFACTANTE

Foi utilizado o tensoativo não - iônico “laurylglucoside 1200”, “Lauryl polyglucoside” ou Plantarem 1200 da marca Emfal – Especialidades Químicas EMFAL - Empresa Fornecedora de Álcool Ltda, CNPJ 65 234 544 / 0001 63. Seu peso molecular é de 348,47g/mol (Chemical Book, 2008; Pub Chem, 2015). A estrutura química do composto é apresentada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura química do composto lauryl glucoside.



Fonte: Chemical Book

4.4 SOBRE O PETRÓLEO

Assim como o consórcio de BRS, as amostras de petróleo também foram provenientes de poços pertencentes à Bacia do Recôncavo Baiano. O óleo foi caracterizado através dos parâmetros de viscosidade (Reômetro physica MCR501) e densidade (Densímetro Digital ISL

VIDA 40H) para ser posteriormente usado nos testes com os microrganismos e nos núcleos porosos. Os testes de recuperação do petróleo seguiram o protocolo descrito por Gudiña et al., 2013.

4.5 MEIOS DE CULTURA E TESTES CINÉTICOS CONTROLE

Para a curva de crescimento foi utilizado o meio mineral (MML) com o lactato de sódio como única fonte de carbono e doador de elétrons. Esse meio é composto por: valores para 1L, 2.5g de acetato de sódio, 6.6g (NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio, 1.8g (NaCl) cloreto de sódio, 0,9g (KH₂PO₄) fosfato de potássio, 0.36g (MgCl₂ · 6H₂O) cloreto de magnésio (hexahidratado), 0.34g (CaCl₂) cloreto de cálcio, 1,25% (v/v) de solução traço de elementos, 12.8g ácido nitriloacético, 1g (FeCl₂·4H₂O) cloreto de ferro (tetrahidratado), 0.5g (MnCl₂·4H₂O) cloreto de manganês (tetrahidratado), 0.3g (CoCl₂· 6H₂O) cloreto de cobalto (hexahidratado), 0.2g (ZnCl₂) cloreto de zinco, 50mg (Na₂MoO₄·2H₂O) molibdato de sódio (dihidratado), 20mg (H₃BO₃) ácido bórico, pH 7,0 (ajuste com NaOH), Sulfeto de Sódio (Na₂S), 0,5mL rezazurina, 2,7mL de lactato de sódio (adaptado de BRANDIS e THAIER, 1981).

Além do cultivo em meio mínimo, também foi usado o meio Postgate C, que é composto pelos seguintes reagentes, em proporções para 1L: NH₄Cl – 1,0g; KH₂PO₄ – 0,5g; CaCl₂·6H₂O – 0,06g; MgCl₂·6H₂O – 0,1g; Na₂SO₄ – 4,5g; MgSO₄ – 0,06g; extrato de levedura – 1g; citrato de sódio – 0,3g; lactato de sódio 6g; rezazurina; 7,0 (ajuste com NaOH), Sulfeto de Sódio (Na₂S) (POSTGATE'S apud ILHAN-SUNGUR, E.; CANSEVER, N.; COTUK, A., 2007). E meio Desulfovibrio com os seguintes componentes com valores para 1L: K₂HPO₄ – 0.5g; NH₄Cl – 1.0g; Na₂SO₄ – 1.0g; CaCl₂·2H₂O – 0.1g; MgSO₄·7H₂O – 2.0g; extrato de levedura – 1,0g; lactato de sódio – 2.0g; rezazurina – 1,0mg; FeSO₄· 7H₂O – 0.5g; tioglicolato de sódio – 0.1g e ácido ascórbico – 0,1g.(DSMZ-Desulfovibrio-Broth). Ambos os meios foram utilizados para ativação das cepas (exceto para *overnight*) e preparação de controles positivos em meio enriquecido.

O meio Postgate modificado foi utilizado para isolar o consórcio de BRS a partir da água produzida. O meio é composto dos seguintes compostos em proporções para 1L: NaCl - 1,%; KH₂PO₄ – 0,05%; NH₄Cl – 0,1%; Na₂SO₄ – 0,1%; CaCl₂ – 0,1%; MgCl₂·6H₂O – 0,183%; extrato de levedura – 0,1%; ácido ascórbico – 0,01%; tioglicolato de sódio –

0,0013%, citrato de sódio – 0,638%; lactato de sódio 0,175%; resazurina 0,025% (m/v) – 0,4% e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05%. (baseado na referência CARVALHO, 2010).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A tensão superficial da água foi mensurada para determinar a CMC do surfactante. A tensão superficial foi medida em diferentes concentrações do surfactante pelo Tensiômetro (KSV-Sigma) com o método do anel Du Nouy em temperatura ambiente. A CMC é dada no ponto de inflexão da curva (baseado em BERA et al., 2013). A CMC pode ser graficamente representada como a mudança da tensão superficial em função da concentração do surfactante, onde um ponto abrupto de mudança da curva é reconhecido (SHEPPARD e MULLIGAN, 1987).

4.7 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA CINÉTICAS

A determinação do consumo de sulfato através das cinéticas de crescimento do consórcio bacteriano e da cepa *Desulfovibrio vulgaris* foram realizadas a partir de um pré-inóculo contendo 10% da suspensão bacteriana (*overnight*) e incubado a 38°C em meio mineral. Todos os meios de cultivo usados durante as cinéticas foram previamente purgados com nitrogênio, assim como o *headspace* dos frascos foi preenchido também com N_2 . As culturas fechadas foram mantidas em frascos ampola (“tipo penicilina”) diferentes e fechados hermeticamente (MAGALHÃES, 2014).

Os testes microbianos foram feitos objetivando avaliar mudanças na fisiologia do consórcio bacteriano e *Desulfovibrio vulgaris* cultivadas em meio mínimo na presença do petróleo e do surfactante. O meio de cultura foi distribuído em frascos do “tipo penicilina”. Os frascos foram esterilizados por 20 minutos por autoclavação a 121°C e 1 atm. Logo após serem retirados da autoclave injetou-se aproximadamente 1,4% de petróleo liquefeito.

A concentração de petróleo de 1,4% adicionada ao meio mínimo foi baseada nos trabalhos de Etoumi (2005; 2008). Segundo Luna et al. (2008) mesmo com o uso de surfactantes, a presença de altas concentrações de petróleo não alteram a atividade das bactérias, ou seja, altas doses de petróleo não alteram a concentração disponível do mesmo em meio de cultura. Apenas a parte biodisponível, ou solúvel em água, é que favorece o crescimento desses microrganismos.

A solução do surfactante foi injetada posteriormente nos frascos já em temperatura ambiente, foi acrescentado nas concentrações de 0.03, 0.06, 0.2, 0.5 e 1.0% (p/v). Controles positivos foram mantidos para avaliar o crescimento do consórcio e da cepa apenas na presença do surfactante com objetivo de evidenciar o potencial da molécula de surfactante como substrato, bem como verificar sua toxicidade, também foram mantido controles em meios enriquecidos. Para a dosagem de sulfato, alíquotas foram retiradas em um período de no máximo 12h. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Testes foram realizados para evidenciar a concentração do surfactante na qual ocorrem as maiores taxas de consumo do sulfato.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO CONSUMO DE SULFATO

O consumo de sulfato foi mensurado através do método de turbidimetria (baseado em KOLMERT et al., 2000 apud LEÃO, 2009) utilizando o espectrofotômetro modelo GENESYS 10S UV-Vis da Thermo Scientific. Para determinação da concentração de sulfato, alíquotas de 2mL foram retiradas com seringas estéreis nos respectivos tempos de cada cinética, as amostras foram centrifugadas a 9.000rpm por 5min sendo repetido esse processo caso não se observasse a formação do *pellet*. Após essa etapa, as amostras foram armazenadas a -20°C até a dosagem de sulfato.

Para quantificação, 1mL das amostras (previamente diluídas em água Milli-Q) era homogeneizado com 1mL de solução condicionante e o cloreto de bário sob agitação por 1min ou até o cloreto de bário ser totalmente diluído e dessa forma, a amostra estava pronta para leitura de absorvância a 420nm. Uma curva - padrão com Na₂SO₄ foi construída. Os dados obtidos a partir da quantificação foram plotados e calculados através de regressão linear.

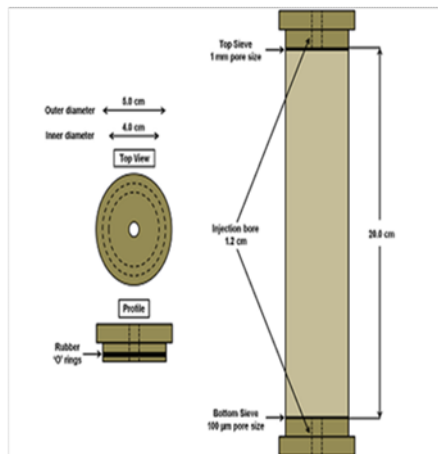
4.9 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA TESTE EM COLUNAS DE AREIA

As colunas utilizadas nesse trabalho foram baseadas em um estudo anterior (GUDIÑA et al., 2013). Esse modelo de colunas foi utilizado para simular o processo de inundação da solução surfactante em um reservatório com óleo adsorvido ao substrato poroso.

Quatro colunas de PVC de 24cm de comprimento e 4cm de diâmetro (FIGURA 7B) foram produzidas seguindo o modelo descrito por Gudiña et al., 2013 (FIGURA 7A). Todo o experimento foi realizado a 40°C, sendo as colunas mantidas em câmara térmica aquecida

contendo uma placa aquecedora para manutenção da temperatura (FIGURA 8). A areia utilizada foi previamente lavada em ácido para eliminar toda a parte orgânica e esterilizada, apresentando faixa granulométrica entre 35-60mesh.

Figura 7. Esquema representando núcleos porosos para simular o ambiente do reservatório. (A) Modelo de colunas sand-pack utiliza por Gudiña et al. (2013). (B) Colunas confeccionadas em PVC para esse estudo.



A



B

Figura 8. Esquema representando sistema para aquecimento e manutenção da temperatura para os experimentos com as colunas. (A) Foto mostrando o sistema fechado. (B) Foto mostrando o sistema aberto evidenciando uma das colunas em posição para o experimento.



A



B

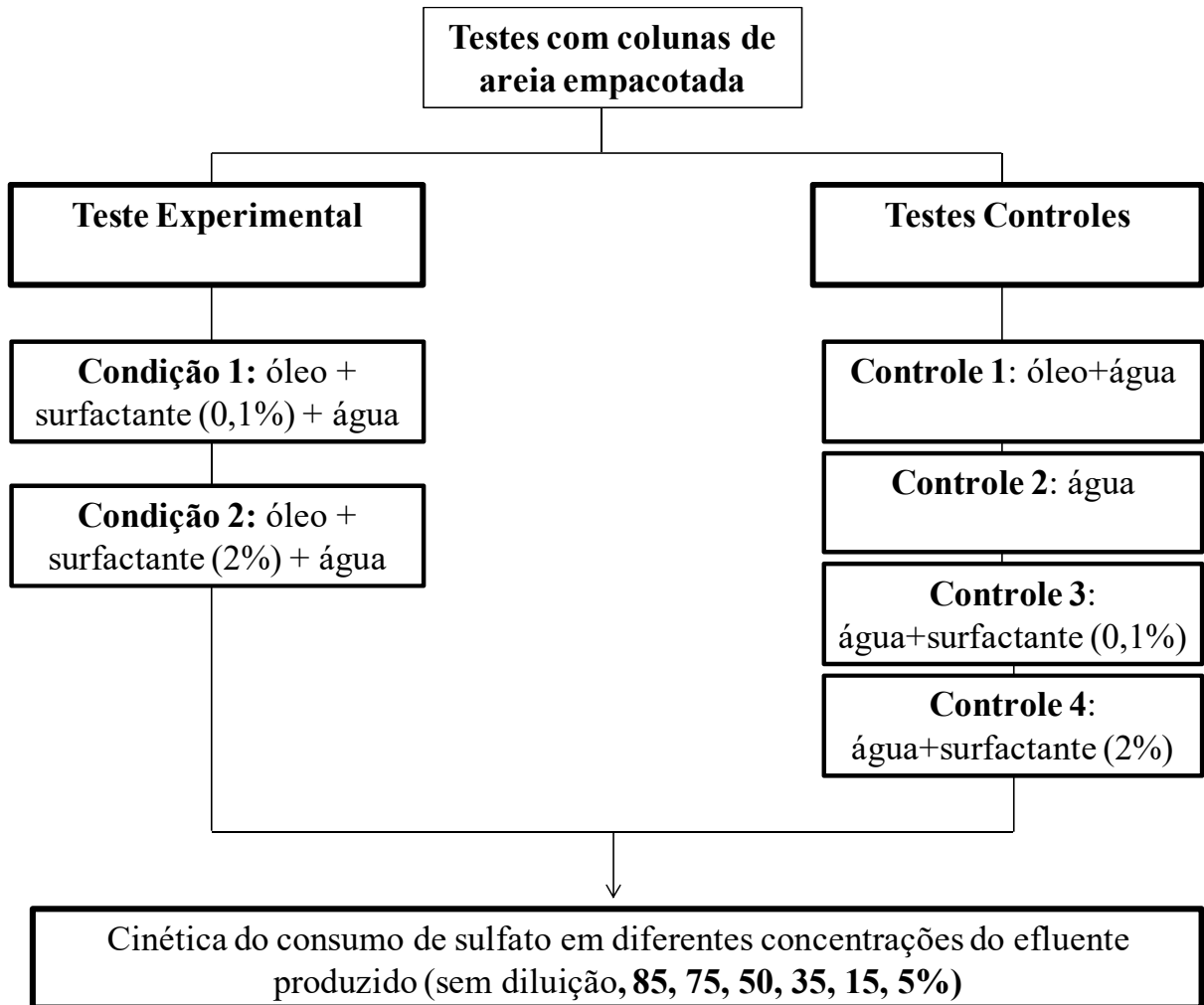
A câmara térmica aquecida foi feita com uma caixa de isopor de 170 litros e uma resistência com termostato foi utilizado para aquecer um recipiente com água utilizado para manter a temperatura.

As colunas foram preenchidas com meio poroso (areia), para simular a aplicação de surfactante na recuperação de petróleo adsorvido na rocha reservatório. O procedimento adotado foi o de produzir um núcleo poroso saturado com petróleo que, depois de serem utilizadas tentativas secundárias de extração, como a injeção de água com salinidade a 1%, fosse aplicada a injeção de surfactante em um processo terciário.

A quantidade de petróleo recuperado após o processo de inundação das colunas com a água de injeção contendo surfactante foi determinado volumetricamente. Adicionalmente, foi retirado o sedimento das colunas após o processo de recuperação e o petróleo retido foi quantificado. Ao final do processo de recuperação uma porção da areia foi coletada da coluna e lavada 5 vezes com o solvente clorofórmio. O clorofórmio foi totalmente evaporado restando apenas a fração do óleo retirado da areia, esse petróleo foi volumetricamente quantificado.

Os testes cinéticos de consumo de sulfato foram realizados com os efluentes obtidos das colunas, as etapas do experimento estão esquematizadas na Figura 9. A meta é a de não apenas testar a eficiência do método de injeção de surfactante na mobilização do petróleo, mas, também, testar o potencial efeito dessa injeção na atividade microbiana, diante disso, controles foram realizados com o objetivo de evidenciar qualquer tipo de outra variável presente na água ou na areia que influenciasse o crescimento das BRS. A hipótese é de que a injeção de surfactantes pode agir como fator estimulante da atividade de BRS e assim aumentar o processo biológico de “souring”.

Figura 9. Fluxograma descrevendo as etapas experimentais realizadas com as colunas de areia.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

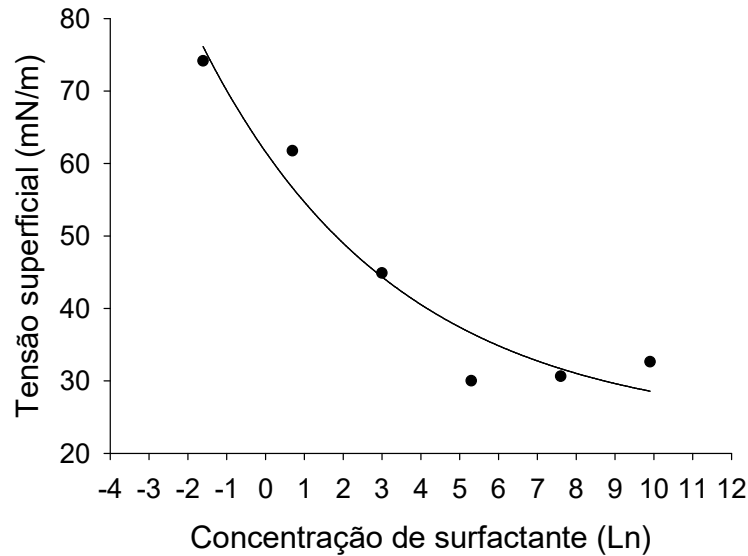
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) DE LAURIL GLICOSÍDEO.

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é um dos principais parâmetros no estudo de tensoativos, já que nessa concentração as soluções de surfactantes promovem a formação de micelas resultando na diminuição na tensão superficial (TS) e interfacial (TIF) favorecendo a emulsificação do óleo (BERA et al., 2011). É por causa desse fenômeno que mesmo em grandes quantidades poucas mudanças são observadas na formação micelar e, conseqüentemente, na TS e TIF (BERA et al., 2011; GHARBI et al., 2012; LUNA et al. 2008; SHEPPARD e MULLIGAN, 1987; TIEHM, 1994). Para realizar o cálculo da CMC é necessário plotar os valores da concentração do surfactante em relação as mudanças de tensão superficial. Como essa relação é exponencial a visualização é melhor quando os valores de concentração do surfactante no gráfico aparecem transformando em Logaritmo Neperiano (LN). A Tabela 1 relaciona os valores de concentração do surfactante transformados em LN em relação a TS que são posteriormente plotados no gráfico da Figura 10 para visualização da CMC.

Tabela 1. Variação dos valores do logaritmo Neperiano da concentração de surfactante em relação a sua tensão superficial que são utilizados para o cálculo da concentração micelar critica do lauril glicosídeo apresentado na Figura 10.

Concentração do surfactante (mg/L)	Ln	Tensão superficial (mN/m)
0,2	-1,6	74,1
2,0	0,7	61,8
20,0	3,0	44,9
200,0	5,3	30,0
2.000,0	7,6	30,6
20.000,0	9,9	32,6

Figura 10. Variação da tensão superficial em diferentes concentrações de surfactante (ver TABELA 1).



De acordo com Bera et al. (2011) a CMC é encontrada no ponto de inflexão da curva referente a TS versus os valores de LN da concentração do surfactante. Nesse trabalho, para auxiliar no cálculo do ponto de inflexão, foi utilizado o modelo Sigmoideal Decay (SigmaPlot, v 11.0) que foi ajustado aos dados experimentais (Figura 10). O modelo indicou que o ponto de inflexão encontra-se próximo ao valor de 4.4. Esse valor corresponde a uma concentração do surfactante de 82ppm. O portfólio da EcoSenseTM uma das empresas especializadas na produção e comercialização do surfactante, informa que a CMC de lauril glucosídeo ou EcoSense 1200 está em torno de 74ppm (ECOSENSE, 2013), corroborando os resultados obtidos nessa pesquisa.

As propriedades de tensão superficial e interfacial são muito importantes na escolha dos surfactantes que serão aplicados nos processos avançados de recuperação. Park, See e Sulaiman (2015) realizaram um estudo com quatro diferentes tipos de surfactantes pertencentes as quatro categorias mais aplicadas na indústria do petróleo, quanto as CMC calculadas a faixa encontrada entre os compostos ficou no intervalo de 39,3 – 1,656mg/L, sendo que o surfactante mais adequado para os processos terciários foi DBS, um surfactante sulfonado com a CMC em 79mg. Essa escolha também foi baseada no fenômeno de adsorção na matriz rochosa. Prazeres et al. (2012) em outro estudo, determina a CMC de surfactantes dos tipos aniônicos (SDS), catiônicos (CTAB) e não iônicos (Triton X-405). Tanto para o

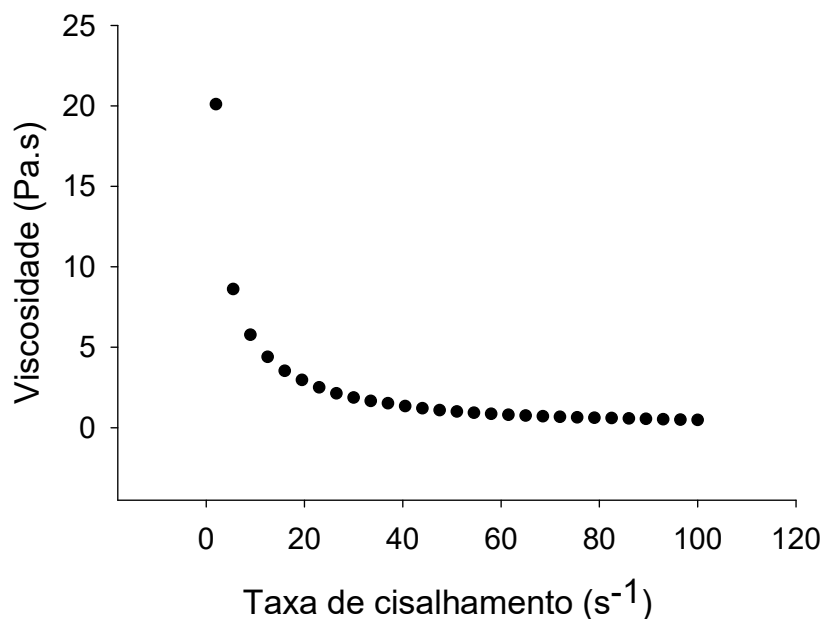
SDS quanto o não iônico Triton os valores da concentração micelar crítica foram maiores que do composto estudado neste trabalho. Portanto, avaliando as propriedades tensoativas pode-se dizer que lauril glicosídeo é um surfactante com propriedades adequadas para a aplicação em processos terciários de recuperação.

Os testes de recuperação de petróleo feito nas colunas de areia foram direcionados com os resultados do cálculo da CMC para o surfactante lauril glicosídeo e valores recomendadas pelas técnicas de EOR. Portanto, todas as concentrações utilizadas foram acima da CMC determinada nesse estudo, uma vez que, em valores inferiores apresentariam baixo desempenho (WEERAWARDENA et al., 2000).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PETRÓLEO

A curva do teste de viscosidade do petróleo utilizado nessa pesquisa está ilustrada na Figura 11 onde nota-se que a viscosidade máxima foi de 20,1 Pa.s. O óleo apresentou um grau de API° 31,5 sendo, portanto, classificado como leve. Os óleos da Bacia do Recôncavo Baiano são tipicamente caracterizados como leves, apresentando grau °API acima de 30, além disso, apresenta alto teor de parafinas, baixo teor de enxofre e de componentes asfálticos (GAGLIANONE e TRINDADE, 1988).

Figura 11. Gráfico de viscosidade do petróleo.



5.3 CÁLCULO DA TAXA DE CONSUMO DE SULFATO NOS TESTES CINÉTICOS COM *DESULFOVIBRIO VULGARIS* E COM O CONSÓRCIO DE BRS.

O inoculo (*overnight*) foi transferido para os reatores de cultura (frascos de penicilina em condições anaeróbias) antes do final da fase exponencial de crescimento para evitar a fase inicial de latência (lag). Dessa forma os microrganismos continuariam crescendo, mas, a sua taxa de crescimento (ou atividade de consumo de sulfato) seria diretamente proporcional a disponibilidade de fonte de carbono (biodisponibilização de petróleo por baixas concentrações de surfactante) e/ou efeito tóxico de substâncias presentes no meio (altas concentrações de surfactante). Nesse ponto vale ressaltar que o próprio surfactante pode ser utilizado como fonte de carbono quando em concentrações não tóxicas. Esse princípio fisiológico que prevê a taxa de crescimento microbiano como diretamente proporcional a concentração de substrato é descrito pelo modelo de Monod. Esse modelo descreve a associação entre o crescimento e a atividade bacteriana como sendo de primeira ordem em relação à concentração de substrato (Equação 2). Isto é, o crescimento ou atividade microbiana é diretamente proporcional à concentração de substrato (S) quando este não se encontra em condições tóxicas e/ou acima de concentrações limitantes.

Equação 2: Modelo de Monod.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

μ = coeficiente de crescimento

μ_{\max} = coeficiente de crescimento máximo

S= concentração de substrato

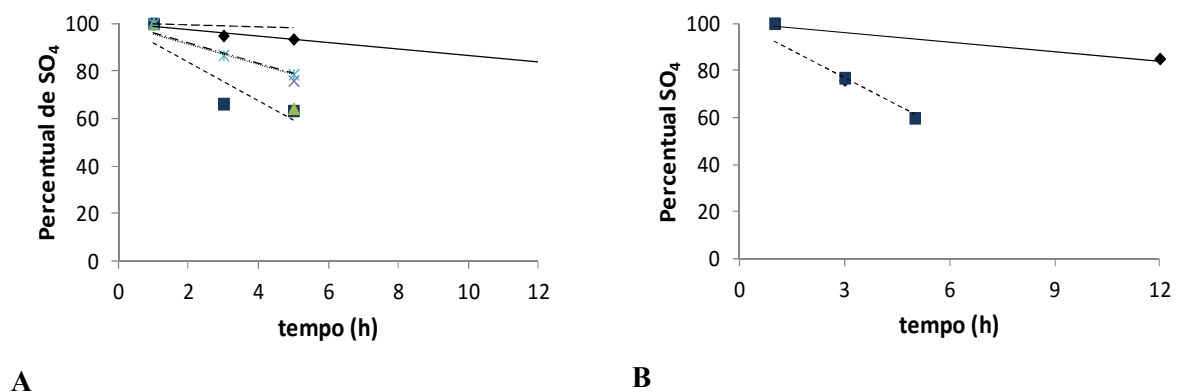
k_s = coeficiente de afinidade

Utilizando a lógica desse princípio fisiológico a atividade microbiana pode ser então estimada a partir do consumo de sulfato. Essa estimativa pode ser feita porque o consumo de sulfato é diretamente proporcional a utilização de substrato (S) que, comumente, resulta no crescimento bacteriano (μ). Essas variáveis são ambas previstas pelo modelo de Monod (Equação 2). Portanto, variações na taxa de consumo de sulfato podem ser utilizadas como indicadores diretos da atividade de BRS (Equação 1), respeitando-se os devidos controles, variando apenas um fator individualmente (concentração do surfactante) e sem a necessidade de aferir diretamente a densidade de microrganismos (biomassa).

Para garantir, portanto, a aplicabilidade do modelo de Monod foi variado apenas um fator em todos os experimentos. Variaram-se as concentrações iniciais do surfactante (0,03 a 1%). Para facilitar a comparação das curvas de consumo de sulfato obtidas com os vários experimentos (Figura 12 e 13), as concentrações de sulfato foram transformadas em percentagens do valor inicial que foi aferido no início de cada batelada teste. Atuando dessa forma, destaca-se o efeito fisiológico causado pela presença do surfactante e evita-se, assim, confundir a lógica dos resultados por causa das variações das concentrações iniciais de sulfato, que não é fator limitante. Variações nas concentrações iniciais são comuns quando os experimentos são realizados em diferentes bateladas, mas, o princípio da técnica é assegurado se as concentrações de sulfato não são limitantes. Os valores originais, que são iguais ou acima da concentração de sulfato encontrada em ambiente marinho, estão expostos no Apêndice A.

Deve-se ressaltar, que em nenhum momento a concentração de sulfato foi limitante durante o teste. As concentrações iniciais de sulfato foram sempre iguais ou maiores que 3%. As concentrações maiores de 3% não representam um problema fisiológico, pois, essa substância não é tóxica para as bactérias e não apresentam choque osmótico como acontece com soluções salinas.

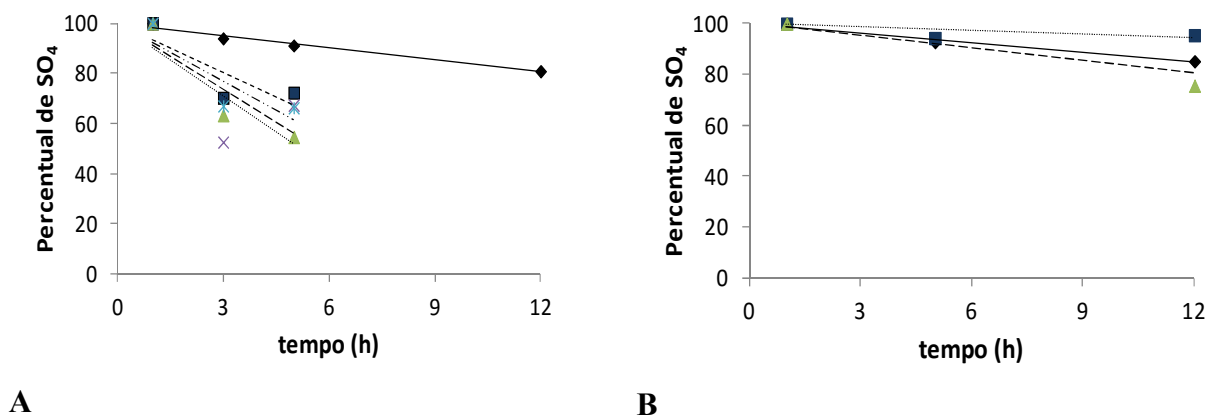
Figura 12. Variação do consumo do sulfato por *D. vulgaris*. Para facilitar o cálculo cinético e melhor visualizar o efeito da variação do surfactante as concentrações de sulfato foram transformadas em percentagem do valor inicial (Apêndice A). Os resultados correspondem a atividade do consumo de sulfato de *D. vulgaris* cultivada em meio mineral contendo petróleo (1,38%) e várias concentrações de surfactante (A) e o experimento controle contendo apenas as respectivas concentrações de surfactante (B). A concentração de surfactante em A e B são de (—) 0,03%, (----) 0,06%, (.....) 0,2%, (---) 0,5% e (-.-.-) 1,0%. Os resultados que não aparecem no gráfico B correspondem ao consumo zero, ou seja, concentrações tóxicas.



Os resultados resumidos nas Figuras 12 e 13 mostram, portanto, um comportamento linear e proporcional do consumo de sulfato as concentrações do biossurfactante nos experimentos. Esse resultado é claro nas concentrações não tóxicas dessa substância. O Tratamento 2 mostrou o maior consumo de sulfato, sendo que o menor valor de consumo foi observado no Tratamento 1. Entre os controles, o controle 2 apresentou a maior taxa de consumo em relação ao controle 1.

Observa-se também que na maioria dos testes os dados de consumo foram obtidos em um período igual ou menor que 12 horas de incubação. Essa observação sugere que os testes fisiológicos além de refletirem as condições impostas pelo experimento, o fazem em um período curto de tempo. Esse fator é relevante para o desenvolvimento de uma técnica de monitoramento da atividade de BRS que gere informação rápida e consistente. As técnicas comumente empregadas para o monitoramento de BRS são demoradas (dias ou semanas) por se basearem no cultivo desses microrganismos. A técnica aqui desenvolvida e testada (Figura 12 e 13) sugere que tal monitoramento pode ser feito em questão de horas através das medidas do consumo de sulfato. Essa característica tem, portanto, capacidade de reduzir custos e gerar informação consistente para um monitoramento mais efetivo de processos de corrosão e de importância para o controle dessas populações.

Figura 13. Variação do consumo do sulfato por um consórcio de BRS isolado de poços de petróleo. Para facilitar o cálculo cinético e melhor visualizar o efeito da variação do surfactante as concentrações de sulfato foram transformadas em porcentagem do valor inicial (Apêndice A). Os resultados correspondem a atividade do consumo de sulfato do consorcio de BRS em meio mineral contendo petróleo (1,38%) e várias concentrações de surfactante (A) e o experimento controle contendo apenas as respectivas concentrações de surfactante (B). As concentrações do surfactante foram: (—) 0,03%, (- - -) 0,06%, (.....) 0,2%, (---) 0,5% e (- · - ·) 1,0%. Os resultados que não aparecem nos gráficos correspondem ao consumo zero resultante da atividade tóxica do surfactante.



5.4 COMPARANDO O CONSUMO DO SULFATO OBSERVADOS COM *DESULFOVIBRIO VULGARIS* E COM O CONSÓRCIO DE BRS.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores das taxas de consumo de sulfato encontradas tanto para o modelo fisiológico de BRS nesse estudo, *Desulfovibrio vulgaris*, quanto pelo consorcio bacteriano de BRS isolado de poços de petróleo em meio mineral adicionado de petróleo e surfactante (tratamentos), controles foram mantidos com o crescimento das BRS com meio suplementado com surfactante sem petróleo e outros controles foram realizados com o meio mineral sem suplementação e meio enriquecido.

Tabela 2. Cinética do consumo de sulfato pela cepa *Desulfovibrio vulgaris* em meio mineral suplementado e não suplementado de 1,38% (v/v) de petróleo e sob as diferentes concentrações (p/v) de surfactante.

Tratamentos com surfactante e com adição de petróleo	Consumo de sulfato (mg/L/h)	Tratamentos controle com surfactante e sem adição de petróleo	Consumo de sulfato (mg/L/h)
Tratamento 1 (0,03%)	94,39	Controle 1 (0,03%)	31,47
Tratamento 2 (0,06%)	596,8	Controle 2 (0,06%)	787,5
Tratamento 3 (0,2%)	487,5	Controle 3 (0,2%)	0
Tratamento 4 (0,5%)	343,7	Controle 4 (0,5%)	0
Tratamento 5 (1%)	320,5	Controle 5 (1%)	0
Meio enriquecido	57,78	Meio mínimo	25,00

A taxa de consumo de sulfato por *D. vulgaris* em meio enriquecido apresentou valores similares aos reportados por Montes (2015). Nota-se que, na maioria dos casos, o consumo foi maior tanto nos testes na presença de petróleo e surfactante quanto na presença apenas do surfactante quando comparado a atividade no meio de cultura enriquecido e em meio mínimo (TABELA 2).

Na concentração de 0,06% (tratamento 2) ocorreu a maior taxa de consumo de sulfato, 596,8 mg/L/h, decrescendo o consumo de acordo com o aumento da proporção do surfactante. Portanto, o surfactante altera as taxas de consumo de sulfato, tendo apresentado um pico de consumo também no controle 2. Em contraste, os Controles 3, 4 e 5 não mostraram nenhum consumo de sulfato.

Tabela 3. Cinética do consumo de sulfato pelo consórcio de BRS em meio mineral suplementado e não suplementado de 1,38% (v/v) de petróleo e sob as diferentes concentrações (p/v) de surfactante.

Tratamentos com surfactante e com adição de petróleo	Consumo de sulfato (mg/L/h)	Tratamentos controle com surfactante e sem adição de petróleo	Consumo de sulfato (mg/L/h)
Tratamento 1 (0,03%)	68,33	Controle 1 (0,03%)	127,6
Tratamento 2 (0,06%)	158,8	Controle 2 (0,06%)	0
Tratamento 3 (0,2%)	360,0	Controle 3 (0,2%)	18,14
Tratamento 4 (0,5%)	219,1	Controle 4 (0,5%)	157,4
Tratamento 5 (1%)	239,9	Controle 5 (1%)	0
Meio enriquecido	25,60	Meio mínimo	2,25

Quanto aos experimentos utilizando o consórcio das BRS, os resultados mostraram que a taxa de consumo de sulfato aumentou até o tratamento 3 que corresponde a concentração de 0,2% de surfactante (TABELA 3). Portanto, o intervalo de concentração de surfactante que exibiu um efeito negativo na atividade de BRS iniciou-se, nesses experimentos, a partir de 1%. Em concentrações menores o surfactante não apenas favoreceu uma maior disponibilidade de hidrocarboneto na fase aquosa como pode ter sido utilizado como fonte de carbono para as BRS. Dessa forma, o aumento na taxa de consumo de sulfato no intervalo de 0,03 a 0,5 % de surfactante deve não apenas ser associado aos valores crescentes de surfactante, mas, também, a maior biodisponibilidade dos hidrocarbonetos.

É sabido da capacidade dos surfactantes em solubilizar componentes hidrofóbicos favorecendo a biodisponibilidade destes em matriz aquosa (ROUSE, 1994). Isso acontece porque, com o aumento do surfactante as cadeias de hidrocarbonetos se tornaram mais acessíveis ao ataque microbiano pelas BRS. No entanto, esse fenômeno tem um limite, pois, é observado que o efeito na formação de micelas e emulsificação do óleo não é diretamente proporcional a altas concentrações do surfactante (Figura 10) e, as altas concentrações são tóxicas aos microrganismos (PIETROSKI, WHITE, DELAUNE, 2015).

O efeito tóxico do surfactante explica a queda no consumo de sulfato (Tabelas 2 e 3). A família de surfactantes a qual o composto utilizado nesse estudo pertence, é tida como biodegradável. No entanto, Garcia et al. (1997) ressalta que a biodegradabilidade dessa substância está associada à sua concentração. Nesse trabalho o efeito tóxico foi estimado como ocorrendo a partir de 0,2% para *D. vulgaris* e 1% para o consórcio de BRS. O consórcio de BRS aparenta apresentar uma tolerância maior a presença do surfactante. Esse resultado não é uma surpresa, pois diferentes espécies bacterianas possuem distintas tolerâncias a compostos tóxicos. Portanto, os resultados obtidos com o consorcio bacteriano identificam essa característica intrínseca aos microrganismos.

5.5 POTENCIAL USO DA EMULSÃO SURFACTANTE E PETRÓLEO COMO FONTES DE CARBONO PARA BRS

Vários autores estudaram a biodegradação de surfactantes, ou seja, sua utilização como fonte de carbono para sustentar a fisiologia e o crescimento bacteriano. Surfactantes são compostos orgânicos anfífilos, ou seja, possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, mas, são passíveis do ataque enzimático microbiano. Portanto, esses compostos orgânicos

podem sustentar o crescimento bacteriano desde que não se encontrem em concentrações tóxicas.

É conhecida a capacidade das BRS de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, não só cadeias mais leves como os alcanos tão presentes nos óleos parafinados (ELSHARKAWY; SAHHAF; FAHIM, 2000), mas também, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), benzeno, tolueno, etilbenzeno, isômeros de xileno (BTEX) (LABAN et al., 2009; LAU et al., 2014; TIEHM, 1994; VOLKERING et al., 1995). A molécula de glicose também pode ser utilizada e é facilmente degradada em condições de anaerobiose (LIAMLEAM e ANNACHHATRE, 2007), portanto, os monômeros do surfactante assim como o petróleo solubilizado tornam-se fontes de energia disponíveis durante os processos de EOR

Para se avaliar o potencial uso do surfactante e o petróleo como fontes de carbono para BRS, foram feitos testes com *D vulgaris* e com um consorcio de BRS isolados de poços de petróleo. A utilização do surfactante foi estimada através da cinética do consumo de sulfato como exemplificado na Equação 1.

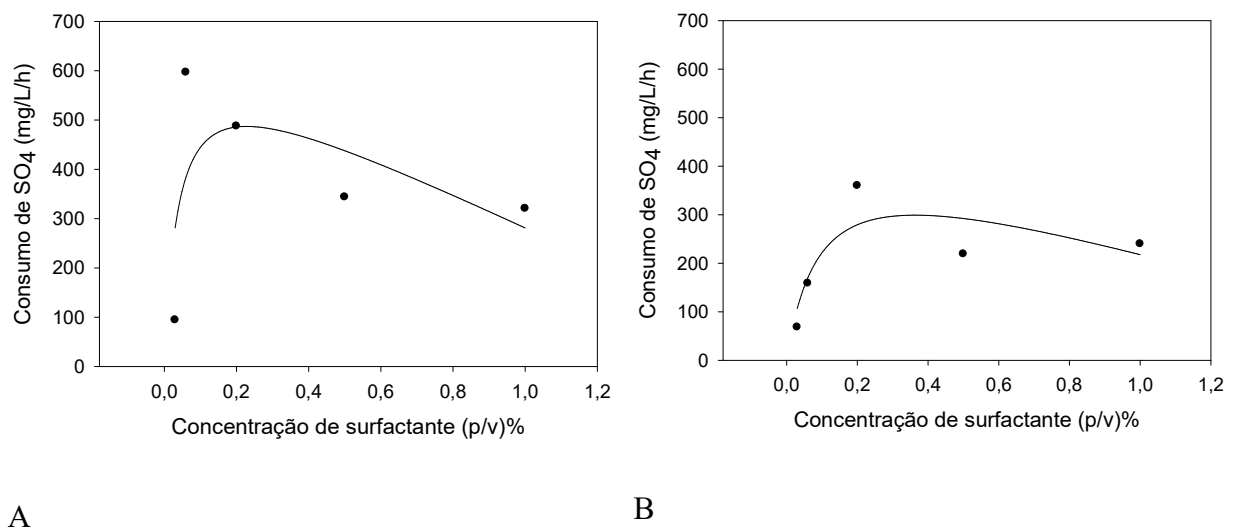
Os testes foram realizados em meio mineral mínimo com a adição de diferentes concentrações do surfactante como fonte adicional de carbono e a concentração de petróleo foi a mesma em todos os testes (TABELAS 2 e 3). A Figura 14 resume a taxa de consumo de sulfato referente as distintas concentrações de surfactantes testadas. Observa-se que a maior taxa de consumo de sulfato ocorreu nos experimentos com o modelo fisiológico para BRS a *D vulgaris* (aproximadamente 600 mg/L/h na concentração de 0,06%). No entanto, observa-se que a tolerância ao efeito tóxico do surfactante é bem restrito as baixas concentrações utilizadas nesse experimento (Figura 14).

Utilizando-se um modelo matemático para interpretar os dados (Figura 14) é possível estimar a concentração do surfactante onde a atividade da BRS é maior, ou seja, onde, provavelmente, está ocorrendo a maior utilização ou biodegradação desse composto junto ao petróleo. Observa-se que as concentrações ótimas estimadas pelo modelo matemático são de 0,14 e 0,21% para a *D vulgaris* e para o consorcio de BRS (Figura 14), respectivamente.

Deve-se ressaltar que a utilização do surfactante e do petróleo solubilizado está diretamente associada a produção de sulfeto (Equação 1). Dessa forma, portanto, a concentração do surfactante onde ocorre o maior consumo de sulfato, ocorre também a maior produção de sulfeto. Esse é um aspecto de significativa relevância para a indústria do petróleo, pois, a adição do surfactante para melhorar a extração de petróleo pode estar também aumentando a produção de sulfeto durante a recuperação terciária. A Figura 14

sugere que uma concentração média de 0,17% do surfactante adicionado na água de injeção pode aumentar significativamente a produção de sulfeto pela microbiota do poço. Levando-se em consideração que esse surfactante irá também melhorar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, a sua utilização em técnicas de recuperação terciária pode impactar consideravelmente a indústria por, assim, complicar os problemas de corrosão relacionados a produção de sulfeto por BRS.

Figura 14. Taxa do consumo de sulfato em diferentes concentrações da emulsão de petróleo com surfactante para *Desulfovibrio vulgaris* (A) e para o consórcio de BRS isolado de poços de petróleo (B). A emulsão utilizada corresponde à concentração de 1,4% de petróleo (v/v) acompanhado por diferentes concentrações de surfactante (p/v). O modelo matemático utilizado para interpretar os dados foi a hipérbole single-retangular do programa SigmaPlot v11. Segundo os dados obtidos a partir do modelo matemático usado as concentrações nas quais ocorre o maior consumo de sulfato estariam entre 0,14 (R2 0,61 e $p \geq 0,05$) para *D. vulgaris* e 0,21% (R2 0,83 e $p \geq 0,05$) para o consórcio de BRS



5.6 RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO E COLETA DE ÁGUA PRODUZIDA EM COLUNAS DE AREIA EMPACOTADA

Para tornar significativo a interpretação dos dados em favor de sua aplicação prática em processos de recuperação terciária de petróleo, testes com núcleo poroso foram realizados baseados na metodologia de Gudiña et al., 2013. Ensaio em colunas de areia empacotada ou núcleos porosos é uma metodologia economicamente viável e cientificamente correta pra se avaliar parâmetros e hipóteses em relação aos aspectos dos poços de petróleo e são amplamente usadas em estudos de métodos de EOR (PEREIRA et al., 2014; KARAMBEIGI et al., 2015; KO et al., 2014; SAMANTA et al., 2011).

O volume do poro (VP) calculado para a coluna teste foi de 140mL, a porosidade é dada através da razão volume do poro sobre volume total da coluna. O volume total da coluna foi de 240mL e o valor final de porosidade foi 58,3% . As etapas operacionais dos experimentos nas colunas estão representadas no item 4.6. A saturação das colunas foi feita com a injeção de 10VP, ou seja, 10 vezes o volume do poro com água uma salinidade de 1% (NaCl). Esse valor de salinidade é recomendado por Samanta et al (2011) e Swadesi et al (2015).

O controle da salinidade é um fator importante nos processos de inundação dos reservatórios de petróleo. Uma vez que, a salinidade está associada em vários aspectos relevantes no que diz respeito aos métodos de EOR, como por exemplo, a molhabilidade da rocha, adsorção e interações iônicas entre tensoativo e o substrato poroso. Diante disso, as composições e a influencia das soluções salinas injetadas nos poços já foram alvo de vários estudos (BUCKLEY e LIU, 1998; MORROW et al., 1998). É sabido também que as soluções de alta salinidade interferem na ação dos surfactantes afetando a concentração micelar crítica e eficácia de emulsificação do óleo (BERA et al., 2013; SPILDO et al., 2014).

Seguindo a indicação de Pereira et al (2014) as colunas testes foram inundadas com quatro vezes o valor de volume de poro (4VP) com a água de injeção contendo o surfactante. Esse procedimento foi realizado para garantir a eficiência de contato entre a água de injeção e o petróleo preso na areia empacotada e assim favorecer sua recuperação em condições próximas às encontradas em campo. Essa operação ocorreu em duas etapas, (i) 4VP com uma água de injeção contendo 0,1% do surfactante e (ii) 4VP com água de injeção contendo 2% do surfactante e ambas com 1% de NaCl. A Tabela 4 resume os valores de petróleo recuperados durante as duas etapas de extração de petróleo com as duas soluções de surfactante utilizadas nessa pesquisa.

Tabela 4: Valores de recuperação do petróleo contido nas colunas de areia após o processo de injeção das soluções com surfactante a 0,1% e 2%.

	Volume recuperado na água de produção (ml)	Volume recuperado No sedimento (extração solido- solvente) (ml/g)	Estimativa da porcentagem de recuperação de petróleo (%)
Petróleo presente no núcleo poroso antes da passagem da água de injeção	-----	0,19	-----
Petróleo presente no núcleo poroso depois da passagem de água de injeção (Fase 1 e 2)	-----	0,08	59,8
Fase 1 -Testes com 0,1% de surfactante	6,00	-----	4,28
Fase 2 -Testes com 2% de surfactante	73,0	-----	54,4 (Total 58,7)
----- dado não disponível			

A primeira fase de recuperação de petróleo, que corresponde a injeção de uma solução do surfactante numa concentração de 0,1%, resultou na obtenção de aproximadamente 4,3% do óleo no sistema. Enquanto que quando injetado uma solução a 2% (p/v) do surfactante a percentagem de recuperação foi de 54.4 %. Essas estimativas foram baseadas em dois métodos distintos de aferir a concentração de óleo recuperado. A Tabela 4 mostra os valores de recuperação de óleo medidos na água produzida quando comparada aos valores obtidos através do método de extração por solvente do óleo remanescente no sedimento. Os resultados obtidos são muito semelhantes e, provavelmente, estatisticamente iguais. Partindo do pressuposto que o fator mundial de recuperação se encontra em uma faixa entre 20-40% (MUGGERIDGE et al., 2014), os valores obtidos sugerem significativa aplicabilidade do surfactante lauril glicosídeo na recuperação terciária de petróleo.

Recentemente vários trabalhos enfocam o uso do grupo dos surfactantes alquil poliglicosídeos (APG) para processos de EOR, por causa de sua capacidade de manter baixos valores de tensão interfacial independentemente da salinidade e temperatura. Diferentes combinações das estruturas químicas de APGs são possíveis e estudos recentes visam intensificar suas propriedades surfactantes ao mesmo tempo em que venha reduzir a sua adsorção na rocha (IGLAUER et al., 2009; 2010).

É recomendável que a água de injeção de recuperação de petróleo contenha uma quantidade do surfactante acima da CMC. Esse fato está relacionado com a perda de surfactante por adsorção na formação rochosa (BERA et al., 2013; SHAMSIJAZEYI, VERDUZCO e HIRASAKI, 2014, 2014) e também pelo próprio consumo do mesmo nas reações de emulsificação com o petróleo. No entanto, por questões econômicas, não se sugere usar o surfactante em concentrações muito elevadas. As soluções usadas na recuperação do petróleo são comumente consideradas como altamente concentradas no intervalo de 2,5-10% e pouco concentradas entre 0,1-0,2% (BERA e MANDAL, 2014). Portanto, nesse estudo, foram realizados testes de extração de petróleo dentro do intervalo de concentração do surfactante classificado como baixo. Sendo essas soluções tipicamente utilizadas em outros estudos (KO et al., 2014; SAMANTA et al., 2011; SWADESI et al., 2015).

5.7 CINÉTICA DE CONSUMO DO SULFATO NOS ENSAIOS COM ÁGUA PRODUZIDA DA RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO

A recuperação terciária do petróleo pode ser realizada através da injeção de uma solução de água contendo o surfactante para aumentar a retirada do óleo da formação rochosa. Essa água de injeção percola por entre a formação rochosa formando uma emulsão composta por água/óleo/surfactante. Esse líquido intersticial pode estar estimulando a atividade de BRS *in situ*, principalmente em regiões onde a concentração da mistura surfactante e óleo não são consideradas tóxicas. Em concentrações não tóxicas, na verdade, essa mistura pode servir como um meio de cultura para BRS aumentando assim a produção de sulfeto. Para testar esse efeito na comunidade de BRS, foram feitos testes de consumo de sulfato, por um consórcio de BRS isoladas de poço de petróleo, com amostras de água produzida obtida no processo de extração do petróleo. A Tabela 5 resume os dados de consumo de sulfato nas condições testadas.

Esse experimento também visou testar um possível efeito da diluição da água de injeção dentro da formação rochosa, o que pode ocorrer a partir do poço de injeção até o poço de coleta. Com a percolação da água de injeção a concentração do surfactante pode ir gradualmente diminuído de concentração a partir do ponto de injeção (efeito de diluição pela matriz rochosa) e esse decréscimo pode influenciar na atividade de BRS. Esse processo de diluição pode acontecer por causa do fenômeno de adsorção do surfactante na matriz rochosa

e/ou pela presença de água intersticial que não contem o surfactante (BERA et al., 2013; SHAMSIJAZEYI, VERDUZCO e HIRASAKI, 2014, 2014)

A Tabela 5 e 6 mostram os resultados do consumo de sulfato do consórcio de BRS utilizando o efluente das colunas de areia (água produzida) *in natura* ou diluída.

Tabela 5. Cinética de consumo de sulfato pelo consórcio bacteriano sob as diferentes diluições (%) dos efluentes gerados a partir da operação das colunas de areia impregnadas com petróleo. As concentrações de sulfato em todos os tempos da cinética encontram-se no Apêndice B.

Efluente 1		Efluente 2	
(água com 1% salinidade e 0,1% surfactante) %	Consumo de sulfato (mg/L/h)	(água com 1% salinidade e 2% surfactante)	Consumo de sulfato (mg/L/h)
Sem diluição	0	Sem diluição	168,7
85	81,25	75	256,2
75	0	50	70,83
50	22,91	35	35,41
35	0	15	0
15	62,50	5	37,50

Utilizando-se do efluente da Fase 1, referente a água de produção coletada de uma coluna que foi inundada com uma solução de 0,1% de surfactante, nota-se que o maior consumo de sulfato ocorreu onde o efluente estava em uma concentração de 85% (v/v) do original. O menor consumo ocorreu na concentração de 50%. Não ocorreu consumo de sulfato nas concentrações de 75 e 35%. Já utilizando o efluente coletado na Fase 2, observou-se que a taxa de consumo de sulfato foi maior na concentração de 75% e menor na de 35%, não sendo detectado consumo na concentração de 15% (TABELA 5). Nesses casos, o consumo zero de sulfato deve estar associado a falta de fonte de carbono gerado pelo processo de diluição de baixas concentrações da emulsão surfactante-petróleo.

Portanto, as modificações químicas tanto do surfactante quanto do óleo podem transformar ambos em potenciais fontes de carbono para a microbiota existente. Deve-se, no entanto, destacar que em alta concentração esse composto pode ser tóxico a essa mesma microbiota. A estrutura química dos surfactantes é responsável tanto pela ação de solubilização e emulsão do óleo quanto pela sua toxicidade. O comprimento da cadeia alquílica é um fator que interfere diretamente na toxicidade da molécula, quanto maior a cadeia mais

tóxico para os organismos e vice versa, principalmente para surfactantes iônicos e não iônicos (LIMA et al., 2011; WOLF e FEIJTEL, 1998). Mas aparentemente todas as classes apresentam certo nível de toxicidade (TIECCO et al., 2013). Esse efeito pode também ser observado durante a aplicação dos métodos de EOR, já que os surfactantes podem desestabilizar as membranas celulares bem como inibir ação enzimática e em consequência o crescimento microbiano além de inibir e até desagregar biofilmes formados pelas BRS.

Tabela 6. Cinética de consumo de sulfato pelo consórcio bacteriano sob as diferentes diluições dos efluentes controles gerados a partir da operação das colunas de areia. As concentrações de sulfato em todos os tempos da cinética encontram-se no Apêndice C.

Diluições dos efluentes (%)	Controle 1* (água com 1% salinidade)	Controle 2** (água com 1% salinidade)	Controle 3** (água com 1% salinidade e 0,1% surfactante)	Controle 4** (água com 1% salinidade e 2% surfactante)
Sem diluição	77,08	0	231,2	66,66
85	268,7	0	43,75	—
75	33,33	0	0	131,2
50	43,75	0	0	256,2
35	6,250	0	0	172,9
15	0	0	0	297,9
5	—	—	—	158,3

* coluna impregnada com petróleo

**colunas sem petróleo

No controle 1 ocorreu um decréscimo no consumo de sulfato até que na diluição de 15% não houve consumo de sulfato. É provável que esse fato se deva a baixa disponibilidade de fontes de carbono. Apesar da coluna está impregnada com óleo não houve injeção de surfactante o que acarretou a não biodisponibilização do óleo. Um processo semelhante ocorreu no controle 3, porém o consumo só foi detectado quando não houve diluição e em 85%. No controle 4, no entanto, foi observado consumo de sulfato em todas as concentrações do efluente, sendo menor onde o efluente não foi diluído, esse fato corrobora a hipótese que o surfactante pode ser usado como fonte de carbono pelas BRS, porém também demonstra um padrão de toxicidade pois, comparado com os testes sem diluição do efluente 2 a taxa de

consumo foi 2,5 vezes menor. Não houve consumo no controle 2, nesse controle a coluna foi inundada apenas com água e não havia petróleo e/ou outro substrato no meio poroso. Pode-se dizer que o estudo da influencia dos fluidos de injeção nas técnicas de EOR nos reservatórios é de suma importância, uma vez que, novas medidas preventivas da biosulfetogênese poderão ser tomadas. É muito importante realizar estudos como esse a respeito de como a comunidade microbiana responderá aos surfactantes introduzidos e a outros compostos, pois se esse fator não for levado em consideração o processo de recuperação terciária se tornará cada vez mais oneroso e economicamente inviável, pois são altos os custos relacionados com o controle das BRS *in situ* (TIU e ADVINCULA, 2015). Estudos similares poderiam elucidar, por exemplo, padrões de inibição para outros tensoativos e minimizar os custos com biocidas e outras substâncias de controle. O fato é que a indústria petrolífera precisará cada vez mais aperfeiçoar o seu conhecimento em relação a microbiota endógena dos reservatórios e assim agregar o conhecimento adquirido com estratégias eficientes de recuperação.

6. CONCLUSÕES

- A partir do modelo sigmoide pode se estimar a CMC de lauril glicosídeo em torno de 82 mg/L, valor bem próximo do proposto por um de seus fabricantes e distribuidores.
- Esse é o primeiro trabalho reportando a aplicação de lauril glicosídeo em métodos de recuperação terciária;
- Os testes cinéticos de consumo de sulfato com *D. vulgaris* e o consórcio de BRS na presença de surfactante mais petróleo mostraram respostas fisiológicas descritas pelo modelo de Monod, validando esse método como parâmetro de avaliação da atividade das BRS;
- As respostas foram obtidas em um período menor ou igual a 12 horas, ou seja, um método rápido e mais econômico em relações a métodos baseados em dias ou semanas de cultivo microbiano para obter resultados;
- A cepa modelo de BRS *D. vulgaris* se mostrou mais sensível à toxicidade do surfactante a partir da concentração de 0,2%, enquanto que, o intervalo tóxico para o consórcio de BRS ocorreu a partir de 1%. A diferença foi associada a características intrínsecas das bactérias;
- Surfactante e petróleo são potenciais fontes de carbono para BRS e as melhores concentrações para a atividade microbiana foram estimadas como sendo de 0,14 e 0,21% para a *D vulgaris* e para o consorcio de BRS, respectivamente;
- Nos testes das colunas, a recuperação do óleo foi de cerca de 60% valor maior que a taxa média mundial de recuperação, tanto na análise volumétrica quanto pela avaliação da concentração de óleo remanescente no sedimento através da extração por solvente;
- Para evitar o aumento da atividade de BRS em poços de petróleo é necessário estimar o efeito da concentração do surfactante juntamente com os possíveis efeitos dos fatores de diluição do mesmo na matriz rochosa.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, V.O. et al. Sonochemical approaches to enhanced oil recovery. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2014.
- ADASANI, A.; BAI, B. Analysis of EOR projects and updated screening criteria. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 79: 10 - 24. 2011.
- AGRAWAL, A.; VANBROEKHOVEN, K.; LAL, B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil – water separation tanks in the north-eastern oil fields of India. **Anaerobe**, 16: 12 –18. 2010.
- AHMADI, M.A.; SHADIZADEH, S.R. Implementation of a high-performance surfactant for enhanced oil recovery from carbonate reservoirs. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 110: 66 – 73. 2013.
- ALMEIDA, P.F. et al. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, 2006.
- ALVARADO, V.; MANRIQUE, E. Enhanced Oil Recovery: An Update Review. **Energies**, 3, 1529 –1575. 2010.
- ARAJI, L.A. et al. Microbial Surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Vol. 15 (3): 99 – 105. 2007.
- BACHMANN, R.T.; JOHNSON, A.C.; EDYVEAN, R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 86: 225 – 237. 2014.
- BABADAGLI, T. Development of mature oil fields - A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 57: 221 – 246. 2007.
- BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, 51: 1 – 12. 1994.
- BEECH, I.B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, 15:181 – 186. 2004.
- BENKA-COKER, M.O.; METSEAGHARUN, W.; J. A. EKUNDAYO, J.A. Abundance of sulphate-reducing bacteria in Niger Delta oilfield waters. **Bioresource Technology**, 54: 151 – 154. 1995.
- BERA, A. et al. Interfacial tension and phase behavior of surfactant-brine–oil system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 383: 114 – 119. 2011.
- BERA, A. et al. Adsorption of surfactants on sand surface in enhanced oil recovery: Isotherms, kinetics and thermodynamic studies. **Applied Surface Science**, 284: 87 – 99. 2013.

- BERA, A.; MANDAL, A. Microemulsions: a novel approach to enhanced oil recovery: a review. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**. 2014.
- BERNADEZ, L.A.; LIMA, R.P.L.A; ALMEIDA, P.F. Corrosion of stainless steels exposed to seawater containing sulfate-reducing bacteria. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**. Vol. 1, N°. 1, p. 51 – 58. 2007.
- BHAGOBATY, R.K. Culture dependent methods for enumeration of sulphate reducing bacteria (SRB) in the Oil and Gas industry. **Reviews in Environmental Science & Biotechnology**, 13:11 – 16. 2014.
- BRADIS, A.; THAUER, R.K. Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulphate as sole energy source. **Journal of General Microbiology**, 126, 249 – 252. 1981.
- BRONW, L.R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, 13:316 – 320. 2010.
- BUCKLEY, J.S.; LIU, Y. Some mechanisms of crude oil/brine/solid interactions. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 20: 155 – 160. 1998.
- CARVALHO, A. S. **Desenvolvimento e Aplicação da Tecnologia de Exclusão Biocompetitiva no Controle da Biosulfetogênese na Indústria de Petróleo na Região da Bahia-Brasil**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.
- CASTRO, H.F.; WILLIAM, N.H.; OGRAM, A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, 31:1 – 9. 2000.
- CIRNE, D.G. et al. Control of sulphide during anaerobic treatment of S-containing wastewaters by adding limited amounts of oxygen or nitrate. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 7:93 – 105. 2008.
- COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, 13: 85 – 103, 2003.
- COMPEAU, G.C.; BARTHA, R. Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Aug., Vol. 50, No. 2, p. 498 – 502. 1985.
- CURBELO, F. D.S. et al. Adsorption of nonionic surfactants in sandstones. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 293: 1 – 4. 2007.
- CHEMICAL BOOK. 2008. Disponível em:
http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2965619_EN.htm. Acesso em: 22/08/2015
- CHRZANOWSKI, L. et al., Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. **Bioresource Technology**, 111: 328 – 335. 2012.
- CSERHATI, T.; FOSGÁCS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**, 28: 337 – 348. 2002.

DELSHAD, M. et al. A simplified model for simulations of alkaline–surfactant–polymer floods. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 108: 1 – 9. 2013.

DESAI, J.D.; BANAT I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Mar., p. 47 – 64. 1997.

DONG, M.; MA, S.; LIU, Q. Enhanced heavy oil recovery through interfacial instability: A study of chemical flooding for Brintnell heavy oil. **Fuel**, 88: 1049 – 1056. 2009.

DHOUIB, A. et al. Degradation of anionic surfactants by *Citrobacter braakii*. **Process Biochemistry**, 38: 1245 – 1250. 2003.

ECOSENSE™ SURFACTANTS. 2013. **A family of naturally sourced, biodegradable surfactants - Overview Literature**. Disponível em: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_08d4/0901b803808d4a93.pdf?filepath=personalcare/pdfs/noreg/324-00450.pdf&fromPage=GetDoc. Acesso em: 14/09/2105.

ENHANCED OIL RECOVERY. 2012. Disponível em: <http://s05.static-shell.com/content/dam/shell/static/future-energy/downloads/eor/eor-brochure-2012.pdf>. Acesso em: 17/10/2014.

ELSHARKAWY, A.M.; SAHHAF, T.A.; FAHIM, M.A. Wax deposition from Middle East crudes. **Fuel**, 79: 1047 – 1055. 2000.

EL-SHESHTAWY, H.S. et al. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**, 24: 155 – 162. 2015.

ETOUMI, A. Microbial treatment of waxy crude oils for mitigation of wax precipitation. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 55: 111 – 121. 2007.

ETOUMI, A et al. The reduction of wax precipitation in waxy crude oils by *Pseudomonas* species. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 35: 1241 – 1245. 2008.

GAGLIANONE, P.C.; TRINDADE, L.A.F. Caracterização geoquímica dos óleos da Bacia do Recôncavo. **Geochimica Brasiliensis**, 2(1):15 – 39. 1988.

GAO, Y.Z. et al. Surfactant-Enhanced Phytoremediation of Soils Contaminated with Hydrophobic Organic Contaminants: Potential and Assessment. **Pedosphere**, 17(4): 409 – 418. 2007.

GAO, Y.Z.; SHARMA, M.M. A family of alkyl sulfate gemini surfactants. 2. Water–oil interfacial tension reduction. **Journal of Colloid and Interface Science**, 407: 375 – 381. 2013.

GARCIA, M.T. et al. Ecological properties of alkylglucosides. **Chemosphere**, Vol. 35, N°. 3, pp. 545 – 556. 1997.

GHARBI, R.; ALAJMI, A.; ALGHARAIB, M. The Potential of a Surfactant/Polymer Flood in a Middle Eastern Reservoir. **Energies**, 5, 58 – 70. 2012.

- GUDIÑA, E.J. et al., Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 68: 56 – 64. 2012.
- GUDIÑA, E.J. et al., Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. **Journal of Hazardous Materials**, 261: 106 – 113. 2013.
- HAN, Y.; ZHANG, W.; XU, J. A performance study of simultaneous microbial removal of NO₂ and SO₂ in a biotrickling-filter under anaerobic condition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol.28 no.2 São Paulo Apr./June. 2011.
- HAO, T.W. et al. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, 65:1 – 21. 2014.
- HAMILTON, W.A. Sulphate-reducing bacteria and the offshore oil industry. **Trends in Biotechnology**, Vol 1, No. 2: 36 – 40. 1983.
- HOWE, A.M. et al., Visualising surfactant enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 480: 449 – 461. 2015.
- IGLAUER, S. et al. Alkyl polyglycoside surfactant–alcohol cosolvent formulations for improved oil recovery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, 339: 48 – 59. 2009.
- IGLAUER, S. et al. New surfactant classes for enhanced oil recovery and their tertiary oil recovery potential. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 71: 23 – 29. 2010.
- ILHAN-SUNGUR, E.; CANSEVER, N.; COTUK, A. Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp.). **Corrosion Science**, 49: 1097 – 1109. 2007.
- ISMAIL, W. et al., Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 84: 168 – 178. 2013.
- JANG, H,Y. et al. Enhanced oil recovery performance and viscosity characteristics of polysaccharide xanthan gum solution. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 21: 741–745. 2015.
- KACZOREK, E.; Urbanowicz, M.; Olszanowski, A. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 81: 363 – 368. 2010.
- KAUR, G. et al. Control of sulfidogenic bacteria in produced water from the Kathloni oilfield in northeast India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63: 151 – 155. 2009.
- KAMAL, M.S.; SULTAN, A.S.; HUSSEIN, I.A. Screening of amphoteric and anionic surfactants for cEOR applications using a novel approach. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 476: 17 – 23. 2015.

- KARAMBEIGI, M.S. Emulsion flooding for enhanced oil recovery: Interactive optimization of phase behavior, microvisual and core-flood experiments. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 29: 382 – 39. 2015.
- KAYALI, I.H.; LIU, S.; MILLER, C. A. Microemulsions containing mixtures of propoxylated sulfates with slightly branched hydrocarbon chains and cationic surfactants with short hydrophobes or PO chains. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 354: 246 – 251. 2010.
- KAZEMPOUR, M. et al. Role of active clays on alkaline–surfactant–polymer formulation performance in sandstone formations. **Fuel**, 104: 593 – 606. 2013.
- KESSEL, D.G. Chemical flooding - status report. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 2: 81 – 101. 1989.
- LABAN, N.A. et al. Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria. **Microbiology Ecology**, 68: 300 – 311. 2009.
- LAU, E.V. et al. Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. **Environmental Pollution**, 184: 640 – 649. 2014.
- LAZAR, I.; PETRISOR, I.G.; YEN, T.F. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, 25:1353 – 1366, 2007.
- LI, X.P. et al. New type flooding systems in enhanced oil recovery. **Chinese Chemical Letters**, 20: 1251 – 1254. 2009.
- LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A.P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, 25: 452 – 463. 2007.
- LIMA, T.M.S. et al. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, 102: 2957 – 2964. 2011.
- LIU, Q. et al. Surfactant enhanced alkaline flooding for Western Canadian heavy oil recovery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 293: 63 – 71. 2007.
- LOTFOLLAHI, M. et al. Development of a hybrid black-oil/surfactant enhanced oil recovery reservoir simulator. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 133: 130 – 146. 2015.
- LU, J. et al. New surfactant developments for chemical enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 120: 94 –101. 2014.
- LUNA, A.S. et al. The effects of surfactants on the estimation of bacterial density in petroleum samples. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 147:77 – 84. 2008.
- MAGALHÃES, R.S. **Estudo de bactérias com atividade antagonista a bactérias redutoras de sulfato oriundas de amostras de água produzida de poços de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal daBahia, Bahia, 2014.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology November**, Vol. 30, N°. 11. 2012.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, 58:428 – 434. 2002.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 22, No. 10, pp. 2280 – 2292, 2003.

KO, M.K. et al. Surfactant flooding characteristics of dodecyl alkyl sulfate for enhanced oil recovery. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 20: 228 – 233. 2014.

MOHANTY, S.S. et al., Kinetics of SO_4^{2-} reduction under different growth media by sulfate reducing bacteria. **BioMetals**, 13: 73 – 76. 2000.

MONTES, D. C. **Determinação de ânions sulfatos e nitratos em amostras aquosas de campos de petróleo como método de monitoramento de Bactérias Redutoras de Sulfato - BRS**. 2015. 129f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

MOOSA, S.; NEMATI, M.; HARRISON, S.T.L. A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, Part I: Effect of sulphate concentration. **Chemical Engineering Science**, 57: 2773 – 2780. 2007.

MORROW, N.R. et al. Prospects of improved oil recovery related to wettability and brine composition. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 20: 267 – 276. 1998.

MUGGERIDGE, A. et al. Recovery rates, enhanced oil recovery and technological limits. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, A372, 20120320. 2014.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant – enhanced remediation of contaminated soil: A review. **Engineering Geology**, 60: 371 – 380. 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133:183 – 198. 2005.

NEMATI, M. et al. Control of biogenic H_2S production with nitrite and molybdate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 26: 350 – 355. 2001.

OILFIELD GLOSSARY. 2015. Disponível em:
<http://www.glossary.oilfield.slb.com/en/Disciplines/Enhanced-Oil-Recovery.aspx>. Acesso em: 02/10/2015.

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. **Petroleum microbiology**. ASM Press, USA, 2005.

OYEKOLA, O.O.; HILLE, R.P.; HARRISON, S.T.L. Kinetic analysis of biological sulphate reduction using lactate as carbon source and electron donor: Effect of sulphate concentration. **Chemical Engineering Science**, 65: 4771 – 4781. 2010.

PALLUD, C.; CAPPELLEN, P.V. Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 70: 1148 – 1162. 2006.

PARK, S.; LEE, E.S.; SULAIMAN, W.R.W. Adsorption behaviors of surfactants for chemical flooding in enhanced oil recovery. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 21: 1239 – 1245. 2015.

PEREIRA, J.F.B. et al. Ionic liquid enhanced oil recovery in sand-pack columns. **Fuel**, 134:196 – 200. 2014.

POSTGATE, J.R. Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. **Bacteriological Reviews**, Dec., Vol. 29, N° 4. 1965.

PIETROSKI, J.P.; WHITE, J.R.; DELAUNE, R.D. Effects of dispersant used for oil spill remediation on nitrogen cycling in Louisiana coastal salt marsh soil. **Chemosphere**, 119: 562 – 567. 2015.

PUBCHEM. 2015. Disponível em:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/93321#section=Top>. Acesso em: 22/08/2015.

PLUGGE, C.M. et al. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. **Frontiers in Microbiology**, Vol 2, Article 81. 2011.

PRAZERES, T.J.V. et al. Determination of the critical micelle concentration of surfactants and amphiphilic block copolymers using coumarin 153. **Inorganica Chimica Acta**, 381: 181 – 187. 2012.

QI, P.; ZHANG, D.; WAN, Y. A novel sulfate-reducing bacteria detection method based on inhibition of cysteine protease activity. **Talanta**, 129: 270 – 275. 2014.

ROSSI, C.G.F.T. et al. Tenssoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica**, RJ, EDUR, vol. 25, n. 1-2, jan-dez, p. 59-71, 2006.

ROUSE, J.D. et al. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 24(4): 325 – 370. 1994.

ROYCHOUDHURY, A.N.; MCCORMICK, D.W. Kinetics of sulfate reduction in a coastal aquifer contaminated with petroleum hydrocarbons. **Biogeochemistry**, 81:17 – 31. 2006.

RUBIO, C. et al. Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. **Journal of Microbiological Methods**, 64: 287 – 296. 2006.

SAMANTA, A. et al. Surfactant and Surfactant-Polymer Flooding for Enhanced Oil Recovery. **CS Canada Advances in Petroleum Exploration and Development**, Vol. 2, N° 1, pp. 13 – 18. 2011.

SANDERSEN, S.B. **Enhanced Oil Recovery with Surfactant Flooding**. Tese (Ph. D). Technical University of Denmark. Dinamarca. 2012.

SANDREA, I.; SANDREA, R. Global Oil Reserves: – Recovery Factors leave vast target for EOR technologies. **Oil & Gas Journal**, 105: 41– 44. 2007.

SANTANNA, V.C. et al. Microemulsion flooding for enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 66: 117 – 120. 2009.

SCHRAMM, L.L.; MARANGONI, D.G. Surfactants and their solutions: Basic principles. **Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry**. Cambridge University Press. Oct., p. 3 – 50. 2000.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, 34: 714 – 724. 2008.

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

SONG, M.; BIELEFELDT, A.R. Toxicity and inhibition of bacterial growth by series of alkylphenol polyethoxylate nonionic surfactants. **Journal of Hazardous Materials**, 219 – 220: 127– 132. 2012.

SHAMSIJAZEYI, H.; VERDUZCO, R.; HIRASAKI, G.J. Reducing adsorption of anionic surfactant for enhanced oil recovery: Part I. Competitive adsorption mechanism. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 453: 162 – 167. 2014.

SHAMSIJAZEYI, H.; VERDUZCO, R.; HIRASAKI, G.J. Reducing adsorption of anionic surfactant for enhanced oil recovery: Part II. **Applied aspects. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 453: 168 – 175. 2014.

SHARMA, M.K.; SHAH, D.O. Use of surfactants in oil recovery. **Developments in Petroleum Science**, Vol. 17, Part B, Pages 255–315. 1989.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied and Microbiology Biotechnology**, 27: 110 – 116. 1987.

SHERRY, A. et al., Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 81: 105 – 113. 2013.

SPILDO, K. et al. A strategy for low cost, effective surfactant injection. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 117: 8 – 14. 2014.

SWADESI, B. et al. The Effect of Surfactant Characteristics on IFT to Improve Oil Recovery in Tempino Light Oil Field Indonesia. **Journal of Engineering and Technological Sciences**. Vol. 47, N^o. 3, 250 – 265. 2015.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, 44: 73 – 94. 2009.

TANJI, Y. et al. Biological souring of crude oil under anaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, 90: 114 – 120. 2014.

TERRY, R.E. In **Encyclopedia of Physical Science and Technology**, 3rd Edition, vol. 18. Robert A. Meyers Ed., Academic Press, p 503-518. 2001.

TIECCO, M. et al. Biocidal and inhibitory activity screening of de novo synthesized surfactants against two eukaryotic and two prokaryotic microbial species. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 111: 407 – 417. 2013.

TIEHM, A. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, Jan., p. 258 – 263. 1994.

TIU, B.D.B.; ADVINCULA, R.C. Polymeric corrosion inhibitors for the oil and gas industry: Design principles and mechanism. **Reactive and Functional Polymers**, 95: 25 – 45. 2015.

VAN BOGAERT, I.N.A. et al. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied and Environmental Microbiology**, 76: 23 – 34. 2007.

VIDELA, H.A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 49:259 – 270. 2002.

VOORDOUW, G. et al. Characterization of 16S rRNA Genes from Oil Field Microbial Communities Indicates the Presence of a Variety of Sulfate Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, May, Vol. 62, n° 5p. 1623–1629. 1996.

VOLKERING, F. et al. Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 61, N° 5, p. 1699 – 1705.1995.

VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; RULKENS, W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, 8: 401 – 417. 1998.

WEERAWARDENA, A. et al. Removal of a solid organic soil from a hard surface by glucose-derived surfactants: effect of surfactant chain length, headgroup polymerisation and anomeric configuration. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 169: 317 – 328. 2000.

WEI, Q.F.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. **Bioresource Technology**, 96 (2005) 331 – 334. 2005.

WEI, L.; MA, F.; Zhao, G. Composition and dynamics of sulfate-reducing bacteria during the waterflooding process in the oil field application. **Bioresource Technology**, 101: 2643 – 265. 2010.

WOLF, W.; FEIJTEL, T. Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (las) in sludge-amended soils. **Chemosphere**, Vol. 36, N° 6, pp. 1319 – 1343. 1998.

WU, Z. et al. Effect of viscosity and interfacial tension of surfactant–polymer flooding on oil recovery in high-temperature and high-salinity reservoirs. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, 4:9 – 16. 2014.

YE, Z, et al. Synthesis and characterization of an associative polymer with an octylphenyl polyoxyethylene side chain as a potential enhanced-oil-recovery chemical. **Journal Applied Polymer Science**, APP.41024. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela com valores referente à quantificação de sulfato das réplicas dos testes cinéticos para o consórcio de BRS e para *D. vulgaris* nas respectivas horas da cinética, esses valores foram usados para calcular o consumo de sulfato através da regressão linear.

Consórcio bacteriano BRS												
Tratamentos com petróleo						Tratamentos sem petróleo						
Tempo (horas)	T1	T2	T3	T4	T5	C1	C2	C3	C4	C5	Meio mineral	Meio enriquecido
0	4800	—	—	—	—	4800	4800	—	—	4800	4800	—
1	4511	7237	9487	9162,5	8800	4454,96	5037,5	5275	6587,5	4076,88	3815,20	3156,25
3	4375	5087,5	6012,5	4825	5900	4089,51	5975	4975	6750	4728,01	—	—
5	3882	5237,5	5187,5	6175	5837,5	—	—	5037,5	4987,5	—	4461,35	3206,25
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2900

<i>Desulfovibrio vulgaris</i>												
Tratamentos com petróleo						Tratamentos sem petróleo						
Tempo (horas)	T1	T2	T3	T4	T5	C1	C2	C3	C4	C5*	Meio mineral	Meio enriquecido
0	4800	—	—	—	4800	4800	—	4800	4800	—	4800	—
1	4559	6525	5475	5725	4162,5	3643,25	7850	ERRO	4812,5	3993,75	4225,56	—
3	4487,5	4325	5962,5	7800	3775	4887,5	6037,5	6087,5	5225	4100	4575	2256,25
5	—	4137,5	3525	4350	—	4081,5	4700	5687,5	5037,5	3918,5	4290,66	1410,75
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4290,87	1508,1

- *Consumo de 18,8, no entanto, devido ao baixo valor do R^2 e avaliação do comportamento microbiano o consumo foi considerado 0.

