



UNIVERSIDADE CATÓLICA DO SALVADOR

**Avaliação da produção de levana por *Zymomonas mobilis*
utilizando diferentes meios de cultura.**

LAÍS FRANÇA FIGUEIRÊDO

**Salvador – Bahia
2019**

LAÍS FRANÇA FIGUEIRÊDO

**Avaliação da produção de levana por *Zymomonas mobilis*
utilizando diferentes meios de cultura**

Trabalho de Conclusão de Curso II
– TCC II apresentada ao Curso de
Bacharelado em Ciências
Biológicas da Universidade Católica
do Salvador (UCSal), como
requisito para obtenção do título de
Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. MSc. Sara Nunes Vaz

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

**Salvador – Bahia
2019**



•NOVA•
UCSAL

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Biologia e Conservação de Ecossistemas Terrestres e Aquáticos
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dez dias do mês de junho de dois mil e dezenove realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão do Curso – TCC intitulado “**Avaliação da produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando diferentes meios de cultura**”, apresentado pela aluna **Láís França Figueiredo**. A apresentação iniciou-se às 09:00 horas, seguida da arguição pela banca examinadora, constituída pelos seguintes profissionais: **Prof. M.Sc. Marcio Silva Rodrigues** e **Prof.^a Dra. Josilene Lima Matos**. A banca examinadora, tendo terminado a apresentação do conteúdo do TCC, passou à arguição da candidata. Encerrados os trabalhos de arguição, os examinadores reuniram-se para avaliação e deram o parecer final sobre a apresentação e defesa oral do candidato, tendo sido atribuído a este a condição de (X) Aprovado () Reprovado. Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, eu, Paulo Tadeu Silva Costa lavrei a presente ata que assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Salvador, 10 de junho de 2019.

Prof. M. Sc. Paulo Tadeu Silva Costa
Coordenador do TCC

Prof.^a M. Sc. Sara Nunes Vaz
Orientador do Trabalho

Prof. M.Sc. Marcio Silva Rodrigues
Membro da Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Josilene Lima Matos
Membro da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor Deus por todas as bênçãos, por todas as dificuldades e conquistas. Toda honra e toda gloria eu dedico a Ti.

Aos meus pais Silvana e Lazaro, por todo amor, carinho, dedicação e incentivo.

Edmundo pelas orientações, apoio, incentivo e avanço profissional e a Daniela por todo carinho.

Aos meus padrinhos Lidiane e meu eterno e amado padrinho Valdimilson (*In Memoriam*) por todo amparo e acolhimento durante essa jornada.

Á minha família (Riusa, Camelita Andrade, Tio Manoel, Lucas, Dindo Aloisio, Dindo Ademario, Gisa, Mônica, Tia Gal, Tio Jonas, Joyce, Tia Tina e Victor), obrigada pelos momentos de distrações, pelos risos e pelas conversas.

Á Família do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismo-LABEM (UFBA-ICS), pela oportunidade e confiança, em especial ao Prof. Paulo Almeida, Prof^a. Josilene, Prof Fabio Chinália e Joalene Ferreira.

Á Prof^a Sara Nunes, pela parceria e confiança. Obrigada por me acolher durante todo esse processo, pelos diálogos e pelos risos. Obrigada pela amizade!

Á Petrogal pela parceria, concessão da bolsa e aceitação/execução do projeto.

RESUMO

O petróleo e seus derivados ainda são as principais fontes de energia na atualidade, sendo indispensável para o crescimento econômico. O desenvolvimento de novas metodologias na exploração e na produção do óleo exige altos investimentos e técnicas avançadas para possibilitar o trabalho em regiões e condições cada vez mais complexas. Dentre as técnicas alternativas sustentáveis encontram-se a injeção de polímeros e surfactantes, que promovem o deslocamento do óleo e conseqüentemente aumenta o fator de recuperação. Esta pesquisa propõe a utilização de três meios de cultura diversificados através de testes experimentais com pequenos volumes de produção, utilizando água produzida (AP) e água destilada suplementada como meio de cultura e por cepas de *Zymomonas mobilis* isoladas, com o objetivo de identificar qual a melhor condição para produção de levana e ampliação do volume 3,5 ml em reator biológico em batelada de 24 h. Os resultados mostraram que o meio de cultura 2 – Meio 2 utilizando água produzida sem diluição (100%) foi o mais favorável na produção de levana, 20 g/l produzido em reator.

Palavras chaves: *Zymomonas mobilis*, levana, água produzida, meio de cultura.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

v/v - Volume/volume

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

AP 50% - Água Produzida com Diluição em 50%

AP - Água Produzida

AP100% - Água Produzida sem Diluição

CCT - Coleção de Culturas Tropical

EPS – Exopolissacarídeos

Z. mobilis - *Zymomonas mobilis*

FOS – Frutoligossacarídeos

H₂O - Água Destilada

g/L e/ou g.L⁻¹ - Gramas Por Litro

h – hora

KH₂PO₄ - Fosfato Monopotássico

L – Litro

ml – Mililitro

pH – Potencial Hidrogeniônico

RM - *Rich Medium*

rpm - Rotações por Minuto

(NH₄)₂SO₄ - Sulfato de Amônio

MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Morfologia *Zymomonas mobilis* Fonte: Autoria Própria..... 15
- Figura 2: Fases metodológicas utilizadas nesta pesquisa. Fase 1, utilização de distintos meios de produção suplementados com água destilada, água produzida com diluição (50%) e água produzida sem diluição (100%). Fase 2, testes com a melhor condição da produção de levana, utilizar o meio que mais produziu levana (g/L), decorrente da Fase 1. Fase 3, uso do biorreator biológico em bateladas de 24 h para testar a produção de levana, utilizando a melhor condição encontrada na Fase 2, ou seja, meio e tipo de meio com maior produção de levana (g/L). Fonte: Autoria Própria..... 19
- Figura 3: Etapas para preparo do pré-inóculo, inóculo e produção da levana. Fonte: Autoria Própria. 21
- Figura 4: (a) Inóculo para meio de produção e (b) Shaker orbital com os erlenmeyers. Fonte: Autoria Própria..... 22
- Figura 5: R1 (réplica 1), R2 (réplica 2), R3 (réplica 3)..... 23
- Figura 6: Fase 2, aumento do volume (500 ml) de produção utilizando o Meio 2, que foi considerado a maior produção de levana (g/L). Fonte: Autoria Própria 24
- Figura 7: Etapas para preparo do meio de produção no biorreator. Fonte: Autoria Própria. 25
- Figura 8: Aspecto macroscópico da goma tipo levana produzida em erlenmeyers com volume 500 ml, água destilada e produzida (50 e 100%) suplementada com os constituintes do Meio 2. Fonte: Autoria Própria. 30
- Figura 9: Produção de goma tipo levana em biorreator com volume 3,5 l, utilizando água produzida (100%) suplementada com os constituintes do Meio 2. Fonte: Autoria Própria. 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação da triplicata de erlenmeyers para Fase 1.	23
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil da produção de levana utilizando três diferentes meios de cultura suplementados com água destilada, AP diluída (AP 50%) e AP sem diluição (AP 100%)..... 28

Gráfico 2: Perfil de produção de levana utilizando o meio de cultivo 2 com suplementação de água destilada e produzida com diluição e sem diluição. Foi utilizado maior volume de produção 500 ml. 29

Gráfico 3: Controle de pH em biorreator com produção de levana em batelada de 24 h. 32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 <i>Zymononas mobilis</i>	14
3.1.1 Produção de Levana	15
3.1.2 Aplicação dos Exopolissacarídeos no Deslocamento de Petróleo	16
3.1.2.1 Água Produzida	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Desenho Experimental	19
4.1.1 Fases Experimentais	20
4.1.1.1 Fase 1: Avaliar a Produção de Levana em bateladas de bancada (erlenmeyers com volume de produção de 300 ml) utilizando-se três meios de produção (Meio 1, 2 e 3).	20
4.1.1.2 Fase 2: Testar a Produção de Levana em bateladas de bancada (erlenmeyers com volume de produção de 500 ml), utilizando o melhor meio de produção da Fase 1.....	20
4.1.1.3 Fase 3: Verificar a Produção de Levana em biorreator biológico em bateladas de produção de 24 h.	20
4.2 Preparo do Inóculo para o Processo Fermentativo	21
4.2.1 Microorganismo	21
4.2.2 Preparo do Pré-Inóculo e Inóculo	21
4.3 Produção de Levana	23
4.3.1 Fase 1: Meio 1	23
4.3.2 Fase 1: Meio 2	23
4.3.3 Fase 1: Meio 3	24

4.3.4 Fase 2: Meio 2	24
4.3.5 Fase 3: Avaliar a Produção de Levana em Reator Biológico	25
4.4 RECUPERAÇÃO DO POLÍMERO	26
4.4.1 Recuperação do Polímero Fases 1 e 2.....	26
4.4.2 Recuperação do Polímero Fases 3	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.2 Fase 2: Testar a produção de levana no meio de cultivo com a maior produção encontrada na Fase 1, em bateladas de bancada de laboratório utilizando-se erleynmeyer em incubadoras tipo Shaker.	29
5.3 Fase 3 :Testar a produção de levana em biorreator biológico (3,5 l) utilizando a melhor condição de produção da Fase 2 testado em bateladas de bancada (erlenmeyer).	30
5.3.1 Análise do pH no reator (variável de processo).....	31
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34
8. ANEXOS	38

1. INTRODUÇÃO

A grande problemática dos campos maduros é a queda da produtividade dos poços de petróleo ao longo da vida produtiva, chegando à completa inviabilidade dos mesmos, devido ao aumento do peso molecular médio do óleo ao longo do tempo de produção (Almeida, et al., 2004). Isto ocorre devido ao fato de que as frações mais leves do petróleo saem no início do processo produtivo devido à maior mobilidade e ao longo do tempo deixam para trás as frações mais pesadas, de difícil remoção da rocha (Almeida, et al., 2006; Almeida & Ramos-de-Souza, 2010). Devido à complexidade dos reservatórios e aos mecanismos ainda pouco eficientes de recuperação apenas uma fração do petróleo existente nos reservatórios é possível de ser recuperada, restando dentro da jazida a maior parte do petróleo originalmente presente (Almeida, et al., 2006).

Desse modo, com objetivo de aumentar a exploração desses campos, várias técnicas especiais de recuperação têm sido empregadas muitas delas são de custo elevado e trazem problemas ambientais. Dentre as técnicas alternativas sustentáveis encontram-se a injeção de polímeros e surfactantes, que promovem o deslocamento do óleo e conseqüentemente aumenta o fator de recuperação (Brauns et al., 2010).

A levana é um exopolissacarídeo obtido pela reação de transfrutossilagem durante a fermentação de culturas *Zymomonas mobilis* quando crescidas em meio rico em sacarose. Esta bactéria tem despertado grande interesse pelos pesquisadores e pelo setor industrial por apresentar altos rendimentos com a produtividade de etanol e também na produção de levana, quando utilizado sacarose como fonte de carbono (Sprenger, 1996). O presente trabalho tem por objetivo principal de avaliar três meios de cultura utilizando água destilada e água produzida com e sem diluição (50 e 100%) respectivamente, utilizados na produção de levana através do microrganismo *Zymomonas mobilis* e identificar a melhor condição para produzir o biopolímero e expandir a produção em reator biológico.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Quantificar a produção de levana por *Zymononas mobilis* utilizando diferentes meios de cultura, a base de resíduos da indústria do petróleo.

2.2 Específicos

- Avaliar a produção de levana em bateladas de bancada (erlenmeyers com volume de produção de 300 ml) utilizando-se três meios de produção (Meio 1, 2 e 3 - Fase 1);
- Testar a produção de levana em bateladas de bancada (erlenmeyers com volume de produção de 500 ml – Fase 2), utilizando o melhor meio de produção da Fase 1;
- Testar a produção de levana em biorreator biológico em batelada de produção de 24 h – Fase 3.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Zymomonas mobilis*

Barker e Hillier (1912) foram os primeiros pesquisadores a estudar a *Zymomonas mobilis* onde de acordo com seus estudos era a bactéria responsável pela deterioração do sabor e do *flavour* de bebidas fermentativas. Estudos mostram que *Z. mobilis* possuem requisitos tecnológicos que se potencializam no processo de fermentação. Dentro desse contexto, *Zymomonas mobilis* é capaz de produzir bioprodutos como levana, etanol e entre outros. A levana é um exopolissacarídeo microbiano (EPS) ou biopolímeros que são formados por monossacarídeos produzidos através do crescimento da bactéria. A *Zymomonas mobilis* produz levana através da reação de transfrutossilacção durante seu crescimento em meio rico em sacarose.

Zymomonas mobilis são bactérias Gram-negativas que podem apresentar 2-6 µm de comprimento e 1-1,5 µm de diâmetro, onde as células podem estar isoladas ou em pares (Figura 1). É uma bactéria anaeróbica facultativa que pode produzir vários subprodutos, tais como, levana, etanol, sorbitol, ácido glucônico e frutoligossacarídeos (FOS), durante esses processos a *Z. mobilis* utiliza somente três açúcares como fonte de carbono e energia que são: glicose, frutose e sacarose. O crescimento em sacarose é acompanhado pela formação extracelular de frutoligossacarídeos (FOS), levana e sorbitol, com significativa redução na síntese de etanol (Swings & De Ley, 1977; Sprenger, 1996; Lee & Huang, 2000; Meirelles, 2010). Podem crescer a baixos valores de pH, entretanto o ótimo crescimento é 7,3 e o pH final após 3 dias a 30° C de crescimento fica na faixa entre 4,5 a 5,2. A temperatura na qual as células de *Zymomonas* crescem é de 25 a 30° C (Swings & De Ley, 1977; Meirelles 2010). O conteúdo celular destes componentes reflete as condições fisiológicas do microrganismo, além de permitir a monitoração do processo fermentativo (Meirelles, 2010). *Z. mobilis* polimeriza a frutose da sacarose provavelmente para reduzir a osmolaridade de meios muito concentrados e, conseqüentemente, o estresse osmótico. A levana é produzida a partir da sacarose, porém a partir de mistura de glicose e frutose não há produção.

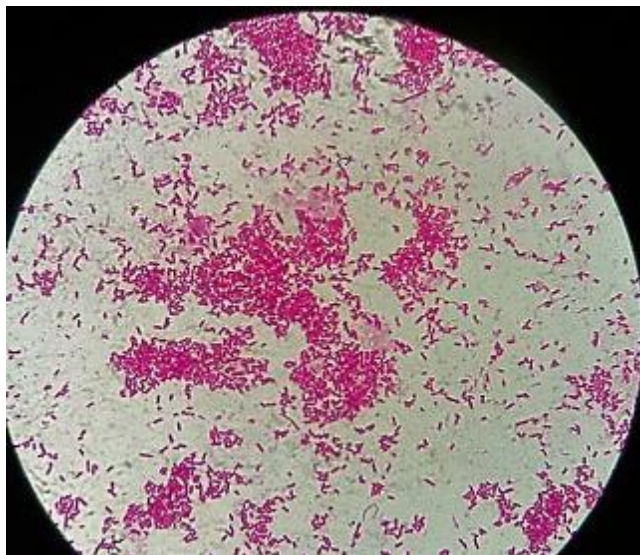


Figura 1: Morfologia *Zymomonas mobilis*

Fonte: Autoria Própria

3.1.1 Produção de Levana

A produção da levana também depende da concentração de sacarose no meio, de forma que se esta for muito baixa (em torno de 0,5 g/L) a formação do produto reduz, e somente frutose livre é liberada para o meio, o que confirma a necessidade de redução do estresse osmótico (Swings & De Ley, 1977). Para a produção de levana por esta bactéria podemos destacar três enzimas hidrolizantes em suas células que são: a) SacA ou InvA (sacarose intracelular); b) B46 ou InvB (sacarose extracelular); e c) SacB. Sendo a SacB uma levanassacorse extracelular responsável pela hidrolise da sacarose e formação da levana (Meirelles, 2010). Durante a pesquisa Viikari & Gisler (1986) constataram a produção de bioprodutos por diferentes linhagens de *Z. mobilis* na fermentação por sacarose. Desta forma, compararam ao todo oito linhagens com hidrolise de sacarose e possível formação de etanol, levana e sorbitol. Os pesquisadores associaram a baixa proporção de hidrolise da sacarose à formação de sorbitol. Em outros estudos, Oliveira et al. (2007) avaliaram que o aumento na produção do polissacarídeo pode estar relacionada à agitação da cultura durante a fermentação, pois a agitação vigorosa e aeração são condições que podem inibir a produção da levana (Meirelles, 2010).

A quantidade de biopolímero produzido pelos microrganismos está relacionada com as condições específicas do crescimento celular e a composição do meio de cultura. Segundo Singh e Fett (1995) o aumento da osmolaridade e a desidratação são também importantes fatores na produção de EPS; em especial o alginato e a levana. A adição de NaCl e etanol, visando o aumento da osmolaridade e desidratação no meio de cultura, aumentaram a capacidade de produção de levana na *Pseudomonas pv. Phaseolicola* (Singh e Fett, 1995).

3.1.2 Aplicação dos Exopolissacarídeos no Deslocamento de Petróleo

O petróleo é considerado uma fonte de energia não renovável de origem fóssil e é a matéria-prima da indústria petroquímica. O petróleo bruto possui em sua composição uma série de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas, o óleo cru. A distribuição destes percentuais de hidrocarbonetos é que define os diversos tipos de petróleo existentes no mundo (Curbelo, 2006). Da quantidade de petróleo existente nos reservatórios, apenas uma pequena fração consegue, na prática, ser retirada. Isso faz com que a maior parte do óleo encontrado permaneça no interior da jazida. O desenvolvimento de metodologias avançadas que permitam extrair mais deste óleo residual permite aumentar a rentabilidade dos campos petrolíferos e estender sua vida útil (Curbelo, 2006).

A recuperação de poços considerados maduros é imprescindível para atender a demanda energética mundial (Shibulal et al., 2014; Bachmann et al., 2014). Durante a exploração de um poço de petróleo, óleos pesados e parafinados são mais difíceis de serem extraídos de poços maduros, ficando uma quantidade significativa destes presos nos reservatórios. Atualmente, o uso de várias tecnologias baseada na atividade de microrganismos propõe aumentar a recuperação de petróleo (Shanshan et al., 2011; Almeida et al., 2004; Sen, 2008). Essas tecnologias são baseadas na estimulação da atividade microbiana *in situ*, ou na utilização de bioativos microbianos produzidos em reatores *ex situ* (Sen, 2008). Essa atividade microbiana é

baseada na produção de exoenzimas, surfactantes e/ou biopolímeros que atuam diretamente na composição química do petróleo e da formação rochosa.

Os exopolissacarídeos (EPS) microbianos também chamados de biopolímeros são macromoléculas formadas por monossacarídeos e derivados ácidos, produzidos durante o crescimento de uma série de gêneros de bactérias, fungos filamentosos, leveduras (Sutherland, 1982). Estes compostos podem ser adicionados à água de injeção e melhorar o seu potencial de recuperação de petróleo por igualar a viscosidades dos fluidos na formação rochosa (Freitas et al., 2011). Para atender a demanda industrial, a levana pode ser produzida em reatores biológicos, onde o processo biológico consiste basicamente na degradação da matéria orgânica pela ação do microrganismo. A degradação da matéria orgânica pode se dar em ambiente sem oxigênio ou em presença de oxigênio, o que distingue os dois tipos de processos biológicos de tratamento: anaeróbios e aeróbios. De maneira geral, nos processos aeróbios a taxa de crescimento microbiano é maior, permitindo uma degradação mais rápida do material orgânico poluente, o que significa menor área ocupada (Bergamasco, 1996).

3.1.2.1 Água Produzida

O petróleo ocorre na natureza em determinadas formações subterrâneas onde se encontra adsorvido nos poros das rochas. Esta rocha pode ser de qualquer origem ou natureza, mas para se construir em um reservatório deve apresentar porosidade (espaços vazios) e permeabilidade (espaços vazios interconectados). Deste modo, podem ser consideradas rochas-reservatório os arenitos e calcarenitos, e todas as rochas sedimentares dotadas de porosidade intergranular que sejam permeáveis (Rosa et al., 2006; Soares, 2012).

Na indústria petrolífera, durante o processo de extração do petróleo e gás, existe a extração também de água, conhecida como água produzida, também presente nos reservatórios de petróleo (Braga, 2008; Campos et al., 2012). Conforme Silva (2008) o impacto ambiental provocado pelo descarte da água produzida é, geralmente, avaliado pela toxicidade dos constituintes e pela

quantidade de compostos orgânicos. Além destes agentes tóxicos, a água produzida ainda apresenta quantidades elevadas de produtos químicos tóxicos adicionados durante o processo de extração do petróleo como: inibidores de corrosão e incrustação, desemulsificantes, polieletrólitos, entre outros (Rocha et al., 2012; Campos et al., 2012).

A origem básica da água produzida juntamente com o petróleo está relacionada às condições ambientais existentes durante a gênese deste óleo. Na formação do reservatório, água e óleo permaneceram em contato por longos períodos geológicos, propiciando a solubilidade de orgânicos. À medida que o poço petrolífero envelhece, a produção de água pode chegar até 100% em volume, em virtude do decaimento da produção de óleo e gás. A água é um dos principais efluentes ligados às atividades de extração e produção do petróleo (Silva, 2008; Campos et al., 2012). Deste modo, água produzida é o efluente resultante dos processos de separação existentes nas estações coletoras de tratamento na produção de petróleo, com o seu crescente volume resultante, constitui-se em um perigo potencial para o meio ambiente. Os riscos ambientais, associados à água produzida, podem variar em função da composição da água, das características do local em que ela ocorre e da sua disposição final. A água produzida apresenta composição variada, que depende das características e profundidade do campo produtor de óleo (Silva, 2008; Campos et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

Neste capítulo apresenta-se as etapas metodológicas adotadas para o desenvolvimento deste trabalho. O diagrama mostrado na figura 2 descreve a lógica dos experimentos. O trabalho foi realizado em três fases distintas. Na Fase 1, foram utilizados três diferentes meios produtivos denominados Meio 1, 2 e 3. Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo: água destilada (H₂O), água produzida (AP) com diluição em 50% e AP sem diluição 100%, todos suplementados com meio de cultura apropriado ao crescimento do microrganismo.

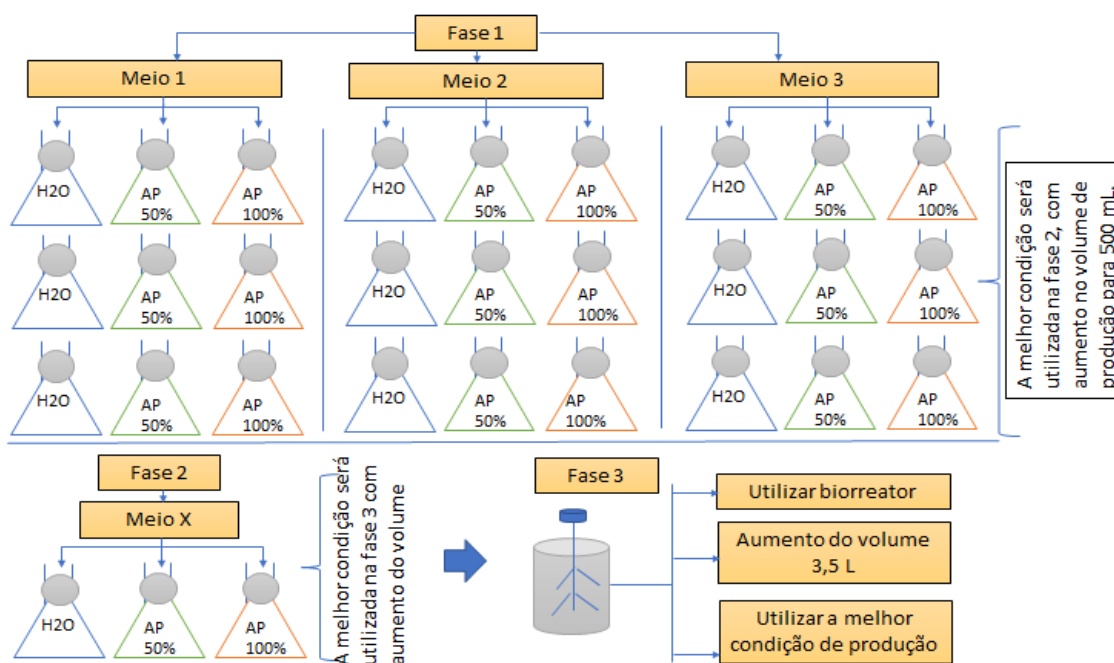


Figura 2: Fases metodológicas utilizadas nesta pesquisa. Fase 1, utilização de distintos meios de produção suplementados com água destilada, água produzida com diluição (50%) e água produzida sem diluição (100%). Fase 2, testes com a melhor condição da produção de levana, utilizar o meio que mais produziu levana (g/L), decorrente da Fase 1. Fase 3, uso do biorreator biológico em bateladas de 24 h para testar a produção de levana, utilizando a melhor condição encontrada na Fase 2, ou seja, meio e tipo de meio com maior produção de levana (g/L).

Fonte: Autoria Própria.

4.1.1 Fases Experimentais

4.1.1.1 Fase 1: Avaliar a Produção de Levana em bateladas de bancada (erlenmeyers com volume de produção de 300 ml) utilizando-se três meios de produção (Meio 1, 2 e 3).

Nesta fase foram utilizadas triplicatas de erlenmeyers de 500 ml contendo 300 ml dos diferentes meios de produção (líquido) – Meio 1, 2 e 3 e inóculo de 10% (v/v). Em todos os meios foram utilizados: água destilada (H₂O), água produzida diluída (AP 50%) e água produzida sem diluição (AP 100%). O objetivo principal foi encontrar a melhor condição para produção da levana, e aplicação na Fase 2, ou seja, descobrir qual o melhor meio de produção e replicar na Fase 2 com aumento do volume de produção (500 ml).

4.1.1.2 Fase 2: Testar a Produção de Levana em bateladas de bancada (erlenmeyers com volume de produção de 500 ml), utilizando o melhor meio de produção da Fase 1.

Nesta fase foi utilizada a melhor condição encontrada para produção de levana entre os diferentes meios de produção da Fase 1. Replicou-se o meio onde houve a melhor produção de levana, com aumento do volume de produção (500 ml) em triplicatas utilizando-se (H₂O, AP 50% e AP 100%) suplementadas. O objetivo foi descobrir qual a melhor condição utilizada no meio de produção, para uso na Fase 3 com aumento do volume (3,5 l), ou seja, observar entre água destilada, água de produção diluída (50%) e água de produção sem diluição (100%) suplementadas qual apresentou a melhor produção de levana.

4.1.1.3 Fase 3: Verificar a Produção de Levana em biorreator biológico em bateladas de produção de 24 h.

Utilizou-se um biorreator biológico com volume útil de 3,5 l e inóculo de 10% (v/v) com a melhor condição de produção da Fase 2.

4.2 Preparo do Inóculo para o Processo Fermentativo

4.2.1 Microorganismo

Nos experimentos para avaliar a produção de levana, utilizou-se cepas de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello – Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP.

4.2.2 Preparo do Pré-Inóculo e Inóculo

A figura 3 mostra as etapas para o preparo do pré-inóculo, inóculo e produção da levana.

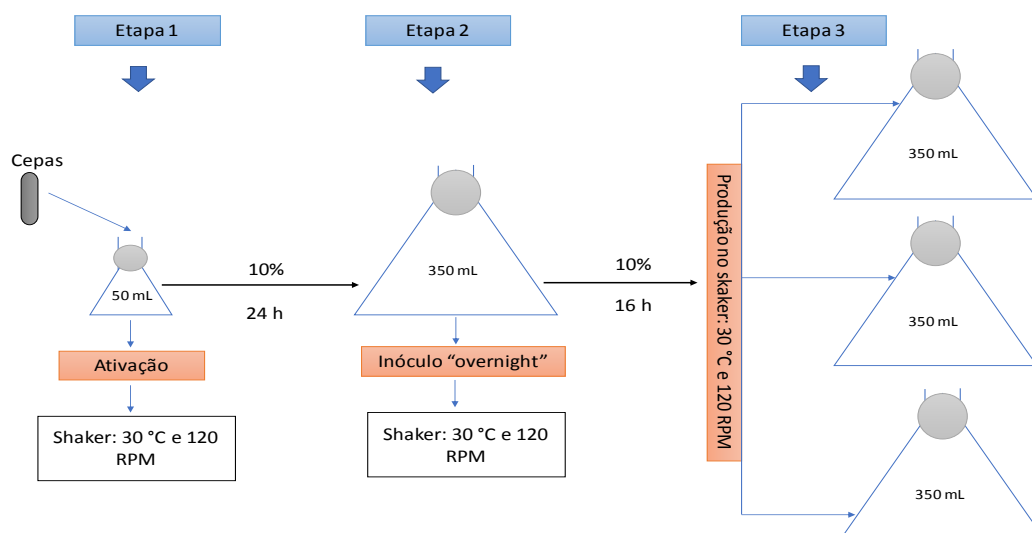


Figura 3: Etapas para preparo do pré-inóculo, inóculo e produção da levana.
Fonte: Autoria Própria.

O meio Rich Medium (RM) proposto por Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) foi utilizado para o preparo do pré-inóculo e inóculo, com pH 7,0. O meio foi esterilizado a temperatura de 121 °C por 15 minutos em autoclave vertical. A partir do pré-inóculo foi feita a ativação do microrganismo, adicionando-se 1 ml da cultura crioconservada, em erlenmeyer individual de 250 ml continha 50 ml de meio de cultivo. Após a ativação o erlenmeyer foi

incubado em agitador orbital a rotação de 120 rpm e temperatura de 30 °C por 24 horas.

Após o período de 24 horas o inóculo foi preparado da seguinte forma: adicionou-se 10% do volume total do pré-inóculo, ou seja: 5 ml do pré-inóculo para 50 ml de meio RM em erlenmeyer com capacidade para 250 ml, em seguida foi incubado em agitador orbital a rotação de 120 rpm, temperatura 30 °C por 12 horas. O experimento foi conduzido de forma asséptica dentro do fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente autoclavado a 121 °C por 20 minutos (Figura 4).

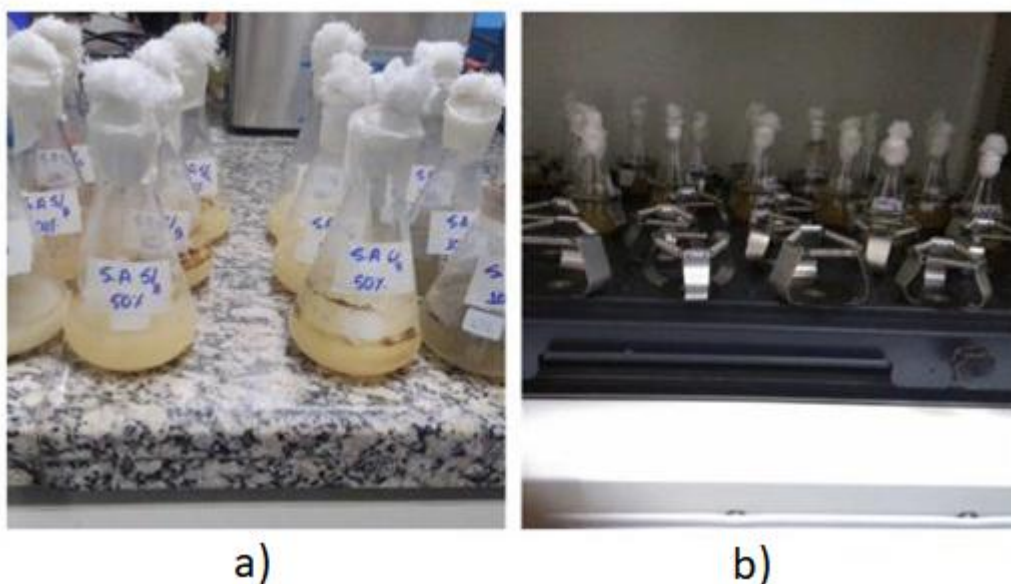


Figura 4: (a) Inóculo para meio de produção e (b) Shaker orbital com os erlenmeyers.
Fonte: Autoria Própria.

4.3 Produção de Levana

4.3.1 Fase 1: Meio 1

Utilizou-se meio Rich Medium (RM) proposto por Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) com as seguintes composições em g.L⁻¹: Sacarose (150); Extrato de Levedura (10) e Fosfato Monopotássico - KH₂PO₄ (2). Para esta etapa foram utilizadas água destilada e água produzida - AP, onde foram suplementadas com os reagentes já descritos. O meio de produção com água destilada foi esterilizado a temperatura de 121 °C por 15 minutos em autoclave vertical. O meio foi distribuído em 9 (nove) erlenmeyers e identificados (tabela 1).

Tabela 1: Identificação da triplicata de erlenmeyers para Fase 1.

Identificação da triplicata de erlenmeyers para Fase 1		
Água Destilada (R1)	AP- 50% (R1)	AP- 100% (R1)
Água Destilada (R2)	AP- 50% (R2)	A.P- 50% (R2)
Água Destilada (R3)	AP- 50% (R3)	A.P- 50% (R3)

Figura 5: R1 (réplica 1), R2 (réplica 2), R3 (réplica 3).

No meio descrito como AP-100% é utilizado água produzida sem diluição e AP-50% com diluição, ou seja, 50% do volume foi água produzida e 50% de água destilada. Os erlenmeyers com os meios foram pasteurizados á 65° C por 30 minutos. Em cada erlernmeyer foram adicionados 350 ml dos respectivos meios conforme a tabela 1 e 35 ml de inóculo *Zymomonas mobilis* foram levados ao agitador orbital por 72 horas.

4.3.2 Fase 1: Meio 2

Para esta produção, o Meio 2 foi adaptado de Ernandes & Cruz (2011) composto em g.L⁻¹: Sacarose (150), Extrato de Levedura (10), Fosfato

Monopotássico – KH_2PO_4 (1), Sulfato de Amônio – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1) e Sulfato de Magnésio – MgSO_4 (1). Foi utilizada a mesma lógica de produção da Fase 1, porém a água destilada (H_2O) e água produzida (AP) foram suplementadas com os reagentes do Meio 2. O meio de produção foi distribuído em triplicata (tabela 1).

4.3.3 Fase 1: Meio 3

O meio de produção foi o mesmo descrito no Meio 2, com ajuste na quantidade da sacarose que foi utilizada 100 g.L^{-1} . Os meios foram preparados da mesma forma que as etapas anteriores, utilizando de água destilada e água produzida - AP suplementados. O meio foi distribuído em 9 (nove) erlenmeyers e identificados conforme (tabela 1).

4.3.4 Fase 2: Meio 2

Dentre os distintos meios avaliados na Fase 1, o Meio 2 foi considerado a melhor condição para produção de levana devido a maior quantidade produzida. Na Fase 2 foi utilizado apenas o Meio 2, em triplicata com água destilada e água produzida com (50%) e sem (100%) de diluição, respectivamente (Figura 6). Nesta fase houve aumento do volume (500 ml) de produção, conforme desenho experimental (Figura 2).

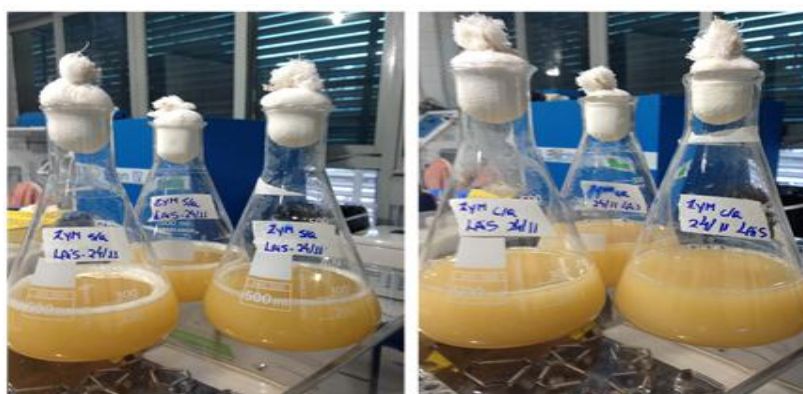


Figura 6: Fase 2, aumento do volume (500 ml) de produção utilizando o Meio 2, que foi considerado a maior produção de levana (g/L).

Fonte: Autoria Própria

4.3.5 Fase 3: Avaliar a Produção de Levana em Reator Biológico

O Meio 2 (com água destilada) foi utilizado para o preparo do pré-inóculo e para o inóculo foi utilizada água produzida (100%) suplementada. O meio de ativação foi esterilizado a temperatura de 121 °C por 20 minutos em autoclave vertical. Devido a utilização de água produzida - A.P, no preparo do meio para o inóculo, este foi pasteurizado a temperatura de 65 °C por 30 minutos seguido de resfriamento. Após o período de 24 h, 10% do volume de ativação foi transferido para o inóculo e após a fase de *overnight* foi inserido no reator biológico. O volume útil de trabalho do biorreator foi o mesmo para todos os experimentos 3,5 L, sendo: 350 ml de inóculo mais 3150 ml de água produzida suplementada (figura 8). O experimento foi conduzido de forma asséptica dentro do fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente autoclavado a 121 °C.

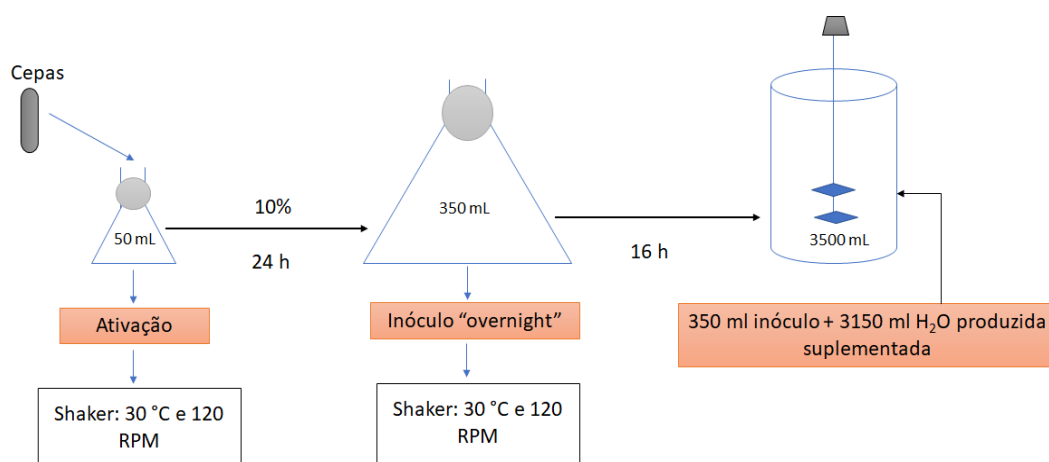


Figura 7: Etapas para preparo do meio de produção no biorreator.
Fonte: Autoria Própria.

4.4 RECUPERAÇÃO DO POLÍMERO

4.4.1 Recuperação do Polímero Fases 1 e 2

Após as 72 horas de incubação, todo o caldo foi adicionado em tubos tipo falcon de 50 ml, centrifugados com rotação 5500 rpm por 40 minutos a 4° C para a remoção das células. Após esse processo, foi transferido 12,5 ml do caldo centrifugado a outro tubo tipo falcon, preenchido com 37,5 ml de etanol e armazenado sob refrigeração a temperatura 4° C por 12 horas. Depois desse período os tubos foram novamente centrifugados a 7000 rpm a 4° C por 30 minutos. As placas de petri foram previamente postas na estufa por 24 horas a 50° C para receber os bioprodutos, e abrigados na estufa a 50 °C até obter o peso constante (peso seco sem variação).

4.4.2 Recuperação do Polímero Fases 3

Neste experimento seguiu-se o mesmo procedimento das Fases 1 e 2. Após 24 horas de produção foi transferido todo o volume de 3,5 L existentes no reator biológico para os tubos tipo falcon de 250 ml, centrifugados com rotação de 5500 rpm por 10 minutos a 4° C para remoção das células. Ao finalizar este processo, foi transferido 250 ml do caldo centrifugado a um vasilhame de vidro e preenchido com 1:3 de etanol e foi armazenado sob refrigeração 4°C por 12 horas. Depois desse período o caldo foi centrifugado a 7000 rpm a 4° C por 30 minutos. As placas de petri foram previamente postas na estufa por 24 horas á 50° C para abrigar os bioprodutos e recolocadas na estufa a 50 °C até obter o peso constante (peso seco sem variação).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa apresenta dados referentes as três fases dos experimentos para produção de levana por *Z. mobilis*, as quais, duas em bateladas de bancada de laboratório utilizando-se erleynmeyer com volumes de produção menores 250 ml na Fase 1 e 500 ml na Fase 2, sendo incubados em Shaker orbital, e a terceira fase (Fase 3) em reator biológico de bancada com volume útil de produção 3,5 L.

5.1 Fase 1: Avaliar a produção de levana em diferentes meios de produção em bateladas de bancada de laboratório utilizando-se erleynmeyer (250 ml).

Nesta fase, realizou-se testes com três meios de cultura para verificar a melhor produção de levana. O gráfico 1 mostra o perfil de produção obtido em cada meio de cultivo na Fase 1. Nos experimentos realizados com o Meio 1, a produção de levana foi de 3,41, 5,10 e 4,53 g/l para água destilada, AP 50% e AP 100 respectivamente, sendo assim os resultados foram inferiores aos Meios 2 e 3. Entre os meios de produção da Fase 1, o Meio 2 obteve a maior produção de levana com valores 11,56, 10,30 e 13,40 g/l utilizando água destilada, AP 50% e AP 100% suplementadas, respectivamente. Já a produção do Meio 3 foi menor que o Meio 2, água destilada, AP 50% e AP 100%, 7,3, 6,36 e 9,8 g/l, respectivamente.

Na primeira Fase (Meio 1) utilizou-se os parâmetros utilizados por Ananthalakshmy & Gunasekaran (1999), onde a produção de levana foi de aproximadamente 12 g/l em meio com alta concentração de açúcar. No entanto, dados do experimento realizado seguindo os mesmos parâmetros diferem do resultado de (Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999). A produção utilizando água destilada é bem menor do que a registrada pelos autores, sendo o experimento com a produção de 3,41 g/l (gráfico 1). Borges (2015) nos seus experimentos conseguiu 10,51 g/l para a produção de levana com 72 h de incubação e com agitação utilizando água produzida suplementada. Nesta pesquisa foi utilizada água produzida com diluição (AP 50%) e sem diluição

(AP 100%) suplementada com o Meio 2 e a produção foi 10,3 e 13,4 g/l, respectivamente. Indicando maior produção com AP 100% quando comparado com o resultado de Borges (2015).

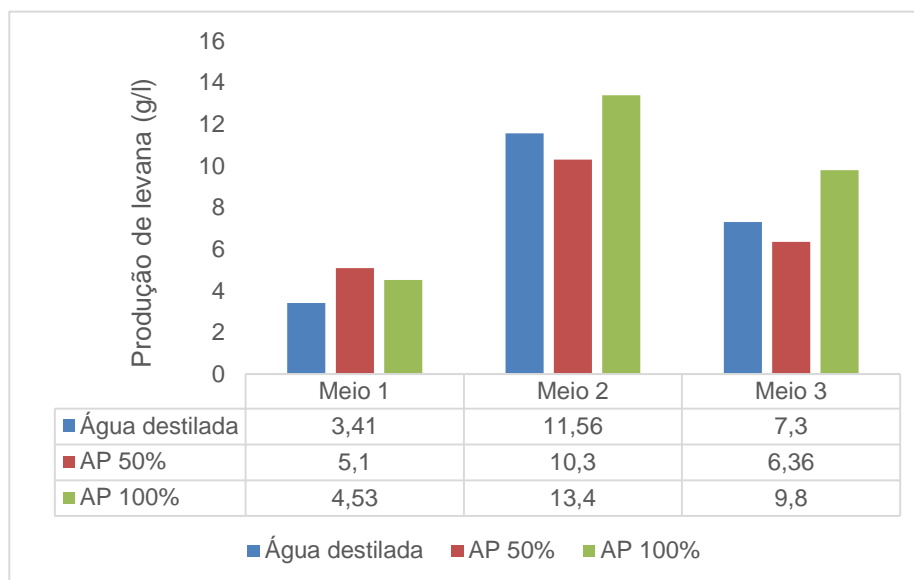


Gráfico 1: Perfil da produção de levana utilizando três diferentes meios de cultura suplementados com água destilada, AP diluída (AP 50%) e AP sem diluição (AP 100%).

Wendt (2001) estudou cepas de *Zymomonas mobilis* mutante obtida através do tratamento da cepa natural com NTG (N - metil N'nitro N'nitroso guanidina). Os dados experimentais revelaram que a linhagem de *Zymomonas* produziu 30 g/l de levana e que a concentração de extrato de levedura pode influenciar a síntese da levana. Ju et al. (1983) identificaram em experimentos que 10 g/L de extrato de levedura seria a concentração ótima à produção de levana. No entanto, Cromie e Doelle (1980) mostraram que elevadas concentrações de extrato de levedura podem aumentar a produção de massa celular e reduzir a produtividade de levana. No entanto, nessa pesquisa utilizou-se também 10 g/L de extrato de levedura no meio de produção e não foi observado elevada produção de biomassa, porém o rendimento na produção de levana foi baixo no Meio 1. Observa-se que nas condições utilizadas na Fase 1, o Meio 2 apresentou a melhor capacidade para produzir levana (11,56; 10,3; e 13,4 g/l água destilada, AP (50% e 100%),

respectivamente. Sendo selecionado para a Fase 2 com aumento do volume de produção (500 ml).

5.2 Fase 2: Testar a produção de levana no meio de cultivo com a maior produção encontrada na Fase 1, em bateladas de bancada de laboratório utilizando-se erlenmeyer em incubadoras tipo Shaker.

Nesta fase, foi realizado testes com o Meio 2 da Fase 1, devido a maior quantidade de levana produzida. Os experimentos foram realizados em triplicatas utilizando água destilada e água produzida com e sem diluição, em volume de 500 ml. O objetivo foi verificar qual condição de processo daria a melhor produção do biopolímero, para utilizar na Fase 3 com aumento de escala de produção em biorreator biológico.

O gráfico 2 apresenta o perfil de produção utilizando o meio 2, no qual a condição com água produzida apresenta a maior produção 15,49 g/l de levana em relação as demais, 9,54 e 8 g/l de água destilada e AP 50%, respectivamente.

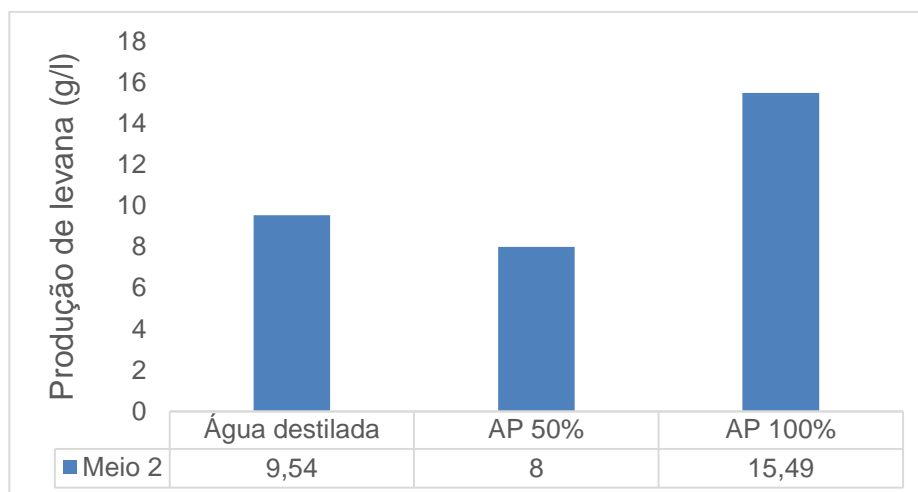


Gráfico 2: Perfil de produção de levana utilizando o meio de cultivo 2 com suplementação de água destilada e produzida com diluição e sem diluição. Foi utilizado maior volume de produção 500 ml.

A figura 8 mostra aspecto macroscópico da goma tipo levana produzida em erlenmeyers com água destilada e produzida (50 e 100%) suplementada

com os constituintes do Meio 2 e incubado por 72 horas em shaker orbital com rotação de 120 rpm e 30 °C. Dentre as condições de produção a AP sem diluição obteve o maior rendimento, 15,4 g/l de levana (Figura 8).

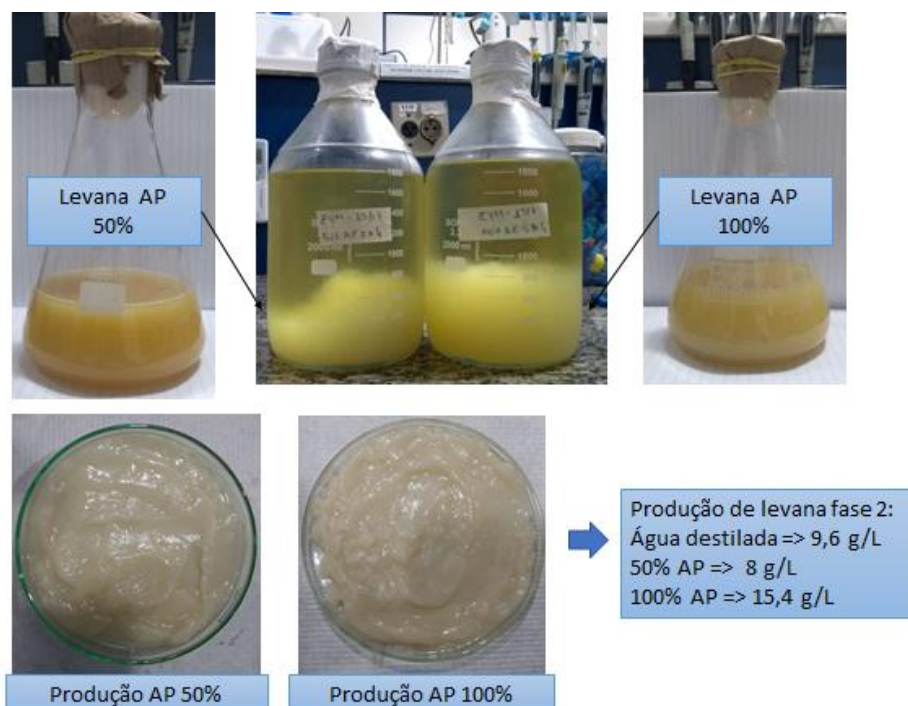


Figura 8: Aspecto macroscópico da goma tipo levana produzida em erlenmeyers com volume 500 ml, água destilada e produzida (50 e 100%) suplementada com os constituintes do Meio 2.

Fonte: Autoria Própria.

5.3 Fase 3 :Testar a produção de levana em biorreator biológico (3,5 l) utilizando a melhor condição de produção da Fase 2 testado em bateladas de bancada (erlenmeyer).

Nesta fase foi avaliado a produção de levana em biorreator biológico utilizando um volume maior (3,5 l), ou seja, maior escala de volume de produção (Figura 9). A condição utilizada foi o meio de produção – Meio 2 avaliado na Fase 1 e água produzida sem diluição (100%) avaliado na Fase 2. Essa condição utilizada no biorreator indicou a maior produção de levana (Figura 8). A produção do biorreator foi em batelada de 24 h, com rotação de

80 rpm e temperatura 30°C. A produção no biorreator foi maior que no erlenmeyer na Fase 2, sendo 20 e 15,4 g/l para produção com volume de 3500 e 500 ml, respectivamente. Enquanto a produção em erlenmeyer durou 72 h com produção de 15,5 g/l, a produção no biorreator foi muito mais rápida e maior, com tempo de batelada de 24 h e produção de 20 g/l de levana, ou seja, uma diferença de 4,5 g/l em relação à produção em erlenmeyer. O biorreator é um sistema dinâmico e fatores como pH e oxigênio podem influenciar muito na eficiência do sistema.

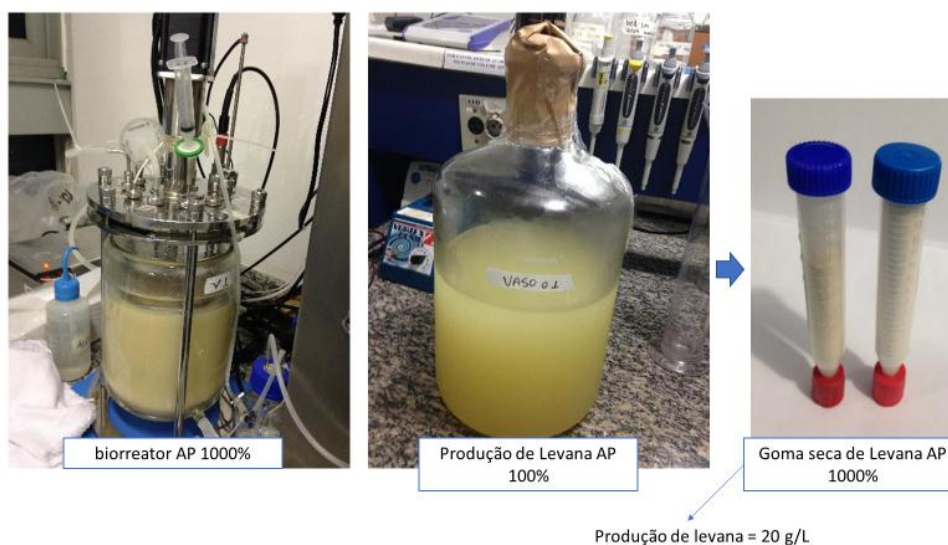


Figura 9: Produção de goma tipo levana em biorreator com volume 3,5 l, utilizando água produzida (100%) suplementada com os constituintes do Meio 2. Fonte: Autoria Própria.

5.3.1 Análise do pH no reator (variável de processo)

O pH inicial do meio de produção foi ajustado para 7,5. O gráfico 3 mostra o perfil do pH durante a fermentação no reator com rotação 80 rpm. Na partida do reator houve redução do pH para 6, atribui-se a esse evento a provável formação de ácidos ou formação de outro produto. Segundo Wendt (2001) o pH entre 4,5 e 5,5 seria ideal para a produção de levana, pois um pH inicial elevado pode reprimir a atividade enzimática das células. No entanto, Ernanes e Cruz (2006) em seus experimentos testaram as condições da produção de levana utilizando cepas de *Zymomonas mobilis* fornecidas por lugares distintos, e em meios de culturas diversos. Os resultados obtidos

indicaram que a linhagem *Zymomonas mobilis* CCT 4494 apresentou a melhor produção de levana com pH inicial 7,0, e temperatura de incubação de 30°C. Nessa pesquisa utilizou-se também cepas de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e condições parecidas com o estudo de Ernanes e Cruz (2006). Durante o experimento só ocorreu ajuste do pH uma vez durante a partida do reator, após esse período não houve necessidade de ajustes, pois o pH permaneceu no limite de controle desejado. Apenas oscilou entre 19 e 20 h, em seguida estabilizando até o final do experimento.

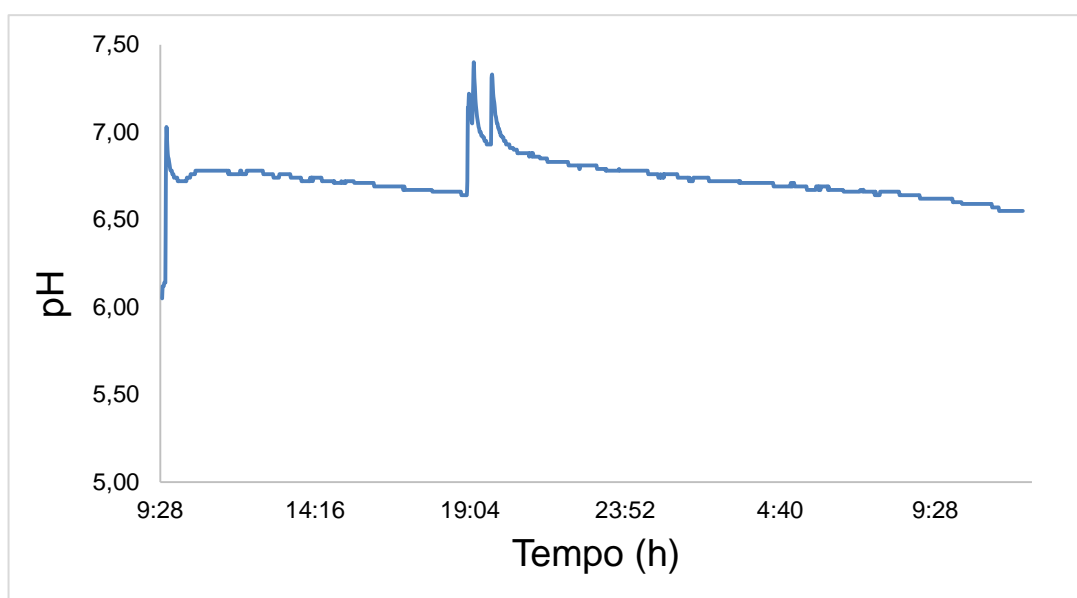


Gráfico 3: Controle de pH em biorreator com produção de levana em batelada de 24 h.

6. CONCLUSÃO

Das bactérias produtoras de levana, *Zymomonas mobilis* tem sido a melhor alternativa, uma vez que usa como fonte de carbono a sacarose ou resíduos industriais contendo açúcar e em diferentes concentrações, em meio rico em sais minerais. A produção de levana é influenciada não apenas pela fonte de carbono e sua concentração, mas também pelas variações de pH, temperatura e tipo de sais presentes, além da oxigenação do meio de fermentação, afetando também as características da molécula e o crescimento celular (Ernandes; Garcia-Cruz, 2005). A levana possuem propriedades reológicas entre eles a viscosidade das soluções e solubilidade em água que se tornaram importantes nas aplicações na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica e de petróleo, onde é habitualmente usada em processo de perfurações para recuperação de óleo. A grande versatilidade da levana é um dos fatores que torna a produção do biopolímero de grande interesse industrial. Muitos trabalhos têm usado resíduos e subprodutos como fonte de carbono como alternativas para a produção de levana, como por exemplo, bagaço de banana, caldo de cana de açúcar, melaço de cana, casca de laranja e bagaço de cana. A partir dos experimentos realizados em bateladas de bancada através de menores volumes de produção (250 e 500 ml) para identificar a melhor condição de produção da levana, foi possível utilizar a fermentação em biorreator com maior volume de produção, em bateladas de 24 h com controle de algumas variáveis de processo como: pH, rotação e temperatura. Foi definido a melhor condição de processo após testes com diferentes meios de produção. Observa-se que a produção no biorreator influenciou positivamente os valores de levana que foi superior a produção em erlenmayer. Pelo grande potencial de aplicações da levana nos setores alimentício, farmacêutico e atualmente na área ambiental, os dados obtidos neste trabalho poderão acrescentar novos conhecimentos na produção de levana utilizando o microrganismo *Zymomonas mobilis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. F., MOREIRA, R. S., ALMEIDA, R. C. C., GUIMARÃES, A. K., CARVALHO, A.S., QUINTELLA, C. M., ESPERIDIÃO, M. C. A., TAFT, C. A. **Selection and application of microorganisms to improve oil recovery.** Eng. Life Sciences, v. 4, n. 4, p. 319-325, 2004.

ALMEIDA, P.F. & RAMOS-DE-SOUZA, E. **Development and application of in situ biotechnological processes to recovery oil in mature oil fields.** Anais da *Rio Oil & Gas Expo and Conference 2010*. 1-8p. V único. Rio, 2010.

ALMEIDA, P.F., ALMEIDA, R.C.C., CARVALHO, E.B., SOUZA, E.R., CARVALHO, A.S., SILVA, C.H.T.P., TAFT, C.A. **Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters.** In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry, 2006.

ANANTHALAKSHMY. V.K; GUNASEKARAN, P. **Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*.** In: Journal of Bioscience and Bioengineering, v.87, N 2, p.214-217, 1999.

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

BARKER, B.T.P., and V.F. HILLIER. 1912. **Cider sickness.** J.Agric. Sei. 5:67-85.

BERGAMASCO, Rosângela. **O uso de partículas poliméricas para adesão microbiana em tratamento biológico de resíduos.** Tese Doutorado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas-SP, 1996.

BORGES, J. A. C. P. **Produção de biopolímero com uso simultâneo de espécies de *Xanthomonas ssp.* e *Zymomonas mobilis*.** 91.p Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia. 2015.

BRAGA, R. M. **Uso de argilominerais e diatomita como adsorvente de fenóis em águas produzidas na indústria de petróleo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Brasil, 2008.

BRAUNS, B.; GUBITOSO, E.B.S; MARINHO, L.C.; GRANDRA, R.M. **Viabilidade técnica e econômica na exploração de petróleo em campos maduros. Uma porta para a indústria nacional.** Anais. VI Congresso Nacional de Excelência em Gestão Energia, Inovação, Tecnologia e Complexidade para a Gestão Sustentável Niterói, RJ, Brasil, 5, 6 e 7 de agosto de 2010.

CAMPOS, WENDELL KLISMANN SANTANA *et al.* **Estudo sobre as principais tecnologias para tratamento da água produzida.** Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT, v. 1, n. 1, p. 141-152, 2012.

CURBELO, FABIOLA DIAS DA SILVA – **Recuperação Avançada de petróleo utilizando tensoativos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Áreas de concentração: Processos de separação e Tecnologia de tensoativos, 2006.

CROMIE, S.; DOELLE, H. W. **Relationship between maintenance energy requirement, mineral salts and efficiency of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*.** Biotechnology Letters, v. 2, n. 8, p. 357-362, 1980.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 26, n. 1, p.71-82, 2005.

ERNANDES, FERNANDA MARIA PAGANE GUERESCHI; CRUZ, CRISPIN HUMBERTO GARCIA. **Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.** Ciência e Agrotecnologia, p. 354-360, 2011.

FREITAS, F. ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. **Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications.** Trends in Biotechnology. V. 29. P. 388–398. 2011.

JU, NAI-HU et al. Continuous ethanol fermentation of *Zymomonas mobilis* using soy flour as a protective agent. **Biotechnology letters**, v. 5, n. 12, p. 837-842, 1983.

LEE, W. C., HUANG, C. T. **Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grow on the media containing glucose and fructose.** Biochemical Engineering Journal, v. 4, p.214-227, 2000.

MEIRELLES, R. M. **Estudo da produção de frutose a partir de levana obtida da sacarose**, 120.p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2010.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. **Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources.** Biochemical Engineering Journal, V. 37, p.177–183, 2007.

ROCHA, J. H. B.; GOMES, M. M. S.; FERNANDES, N. S.; SILVA, D. R.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. **Application of electrochemical oxidation as alternative treatment of produced water generated by Brazilian petrochemical industry.** Fuel Processing Technology. v. 96. p. 80 – 87, 2012.

ROSA, A. J.; CARVALHO, R. S.; XAVIER, J. A.D. **Engenharia De Reservatórios De Petróleo.** Editora Iterciência, Rio de Janeiro, 2006.

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

SHANSHAN, S.; ZHONGZHI, Z.; YIJING, L.; WEIZHANG, Z.; MENG, X.; WENJING, Y.; LI, Y.; PENGCHENG, F. **Exopolysaccharide production by genelically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery.** Bioresource Technology. v.102, p. 6153 – 6158, 2011.

SHIBULAL, B.; BAHRY, S. N. A.; WAHAIBI, Y.M.A; ELSHAFIE, A.E.; AL-BERMANI, A.S.; JOSHI, S.J. **Microbial Enhanced Heavy Oil Recovery by the**

Aid of Inhabitant Spore-Forming Bacteria: An Insight Review. Hindawi Publishing Corporation. The ScientificWorld Journal. P.12 2014.

SILVA, P. K. L. **Remoção de óleo da água de produção por flotação em coluna utilizando tensoativos de origem vegetal.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Brasil, 2008.

SINGH, S.; FETT, W. F. **Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity.** FEMS Microbiology Letters, v.130 (2-3), p.301-306, 1995.

SOARES, ANA PAULA JUSTINO – **Aplicação de microemulsão na recuperação de petróleo de reservatórios carbonáticos.** Dissertação de mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, area de Concentração: Engenharia Química, 2012.

SPRENGER, G. A. **Carbohydrate metabolismo in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes.** FEMS Microbiology Letters, v. 145, p.301-307, 1996.

SUTHERLAND, I. W. **Biosynthesis of microbial exopolysaccharides.** Advances in Microbial Physiology. v. 23, p. 80-142, 1982.

SWINGS, J.; DE LEY, J. **The Biology of *Zymomonas mobilis*.** Bacteriological Review, v. 41, n. 1, p.1-46, 1977.

VIKARI, L.; GISLER, R. **By-products in the fermentation of sucrose by different strains.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 23, p. 240-244, 1986.

WENDT, RAQUEL. **Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas Mobilis*.** Campinas, SP: [s.n.], 2001.

8. ANEXOS

Participação em dois resumos aceitos para apresentação em Congresso Internacional (7th International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (ISMOS-7) no Canadá.