# Uso de Bactérias para Recuperação Avançada de Petróleo

Leonardo Sorence Borges[1,2], Elen Aquino Perpetuo[1], Camilo Dias Seabra Pereira[1,2]

[1]Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Santos-SP, Brasil
[2]Universidade Santa Cecília (UNISANTA) - Santos-SP, Brasil

E-mail: Leonardo.sorence19@unifesp.br

**Resumo:** As tecnologias atuais de exploração petrolífera permitem a retirada média de apenas 1/3 do óleo presente nos reservatórios. Estima-se que, somente no subsolo dos Estados Unidos, 300 bilhões de barris de petróleo deixaram de ser explorados. Técnicas de recuperação avançada bacterianas são suprimidas ou ignoradas em projetos de exploração por causa de resultados inconclusivos, os quais, geram incertezas sobre sua segurança. Entretanto, estas representam uma alternativa ecologicamente correta e sustentável por evitar a contaminação do ambiente com agentes químicos usados em outros métodos. Entender a atividade microbiana é atualmente um desafio para ciência moderna devido a dificuldade de elucidar as condições físico-químicas e nutricionais solicitadas pela cultura no seu desenvolvimento, além de mecanismos genéticos e biomoleculares de sintrofia. O objetivo desse trabalho é caracterizar e identificar culturas de bactérias aumentando o entendimento das interações microbianas em contato com petróleo em condições de reservatório para buscar aumentar o fator de recuperação de óleo.
**Palavras-chave:** Petróleo; Oxidação; Sintrofia; Bactérias; Recuperação Avançada.

# Use of Bacteria for Advanced Oil Recovery

**Abstract:** Current oil exploration technologies allow the average removal of only 1/3 of the oil present in reservoirs. It is estimated that, in the underground of the United States alone, 300 billion barrels of oil were left unexplored. Advanced bacterial recovery techniques are suppressed or ignored in exploration projects because of inconclusive results, which create uncertainty about their safety. However, these represent an ecologically correct and sustainable alternative for avoiding the contamination of the environment with chemical agents used in other methods. Understanding the microbial activity is currently a challenge for modern science due to the difficulty in elucidating the physical-chemical and nutritional conditions required by the culture in its development, in addition to genetic and biomolecular mechanisms of syntrophy. The objective of this work is to characterize and identify bacterial cultures increasing the understanding of microbial interactions in contact with oil under reservoir conditions in order to increase the oil recovery factor.
**Keywords:** Oil; Oxidation; Syntrophy; Bacteria; Advanced Recovery

## Introdução

A exploração de petróleo está intimamente ligada ao retorno financeiro que o projeto irá fornecer. Esse fator econômico foi o vetor que direcionou as escolhas exploratórias das centenas de empresas no mundo inteiro nas últimas décadas e se relaciona com a quantidade de petróleo retirada da jazida. Técnicas primárias retiram de 10% a 20% do óleo, em seguida as secundárias podem atingir de 30% a 40% dos recursos. Mesmo após esse esforço de engenharia quase metade da jazida ainda permanece inexplorada. Ainda, aproximadamente 40% das reservas petrolíferas mundiais são compostas de óleo pesado e extra-pesado e apresentam dificuldade para serem extraídos [1]. Nesse momento são aplicadas técnicas terciárias, das quais a mais

utilizada é a de métodos químicos (CEOR – Chemical enhanced oil recovery) que injeta gases, polímeros e surfactantes sintéticos chegando a 30% de recuperação, mas traz consigo alto risco ambiental e custo financeiro. Em oposição, a Técnica MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) injeta bactérias e nutrientes oferecendo a possibilidade de recuperação acima de 70% com baixos custos comparados como mostra a figura 1 abaixo, além de significativa redução de risco e impacto ambiental.

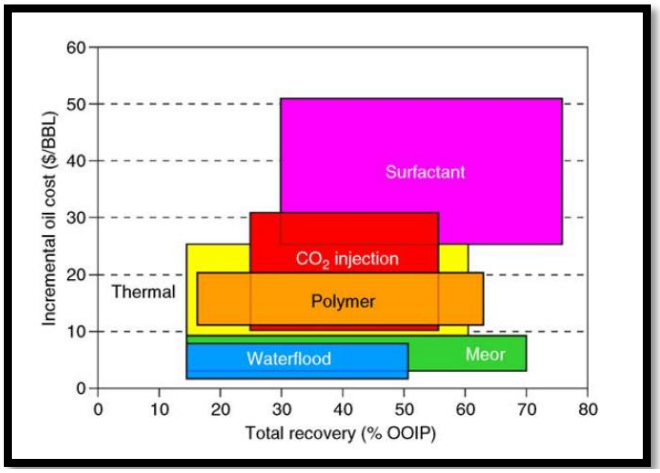



Figura 1- Comparação do custo de aplicação da técnica meor em relação as outras técnicas de recuperação avançadas (Mcgenity *et al*, 2010)

Entretanto, há limitações técnicas em conseguir controlar o consórcio microbiano que pode ser gerado *in situ*, após a inoculação de cepas de bactérias selvagens em um reservatório de petróleo avaliado em muitos milhões de dólares [2]. Na realidade a ciência está nos passos iniciais para elucidar as dinâmicas envolvidas nos consórcios microbianos, pois experimentos modernos preveem e modelam crescimentos de no máximo duas ou três cepas de forma razoável, mas ainda com dificuldades [3,4] o que mostra o grau de complexidade exigido na compreensão do metabolismo bacteriano e suas interações se considerarmos que apenas 1% dos micro-organismos são cultiváveis e um grama de solo pode conter aproximadamente um milhão de espécies diferentes.

**Objetivos:** O objetivo desse trabalho é caracterizar e identificar culturas de bactérias aumentando o entendimento das interações microbianas em contato com petróleo para buscar aumentar o fator de recuperação de óleo através da técnica MEOR.

## Material e Métodos

Foi realizado o enriquecimento seletivo e isolamento de micro-organismos de uma amostra de petróleo obtida da Petrobras S.A., contendo fase água e fase óleo. A amostra de petróleo (20 mL) foi incubada em 180 mL meio rico (caldo nutriente). A incubação foi realizada em laboratório a 37 °C durante 21 dias sob agitação (200 rpm) e com tampão de algodão, que permitia trocas gasosas, em uma incubadora INFORTS- NT – ECOTRON. Outra amostra, nas mesmas condições, foi incubada na ausência de agitação, a fim de promover o enriquecimento da amostra com micro-organismos preferencialmente anaeróbios o frasco foi selado com tampa de borracha. O método de identificação das bactérias, foi espectrometria de massas MALDI-TOF, cobertas com 1 µL da solução matriz (que consiste numa solução saturada de α-ciano-4-hidroxi-

ácidocinâmico em 50% acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético) e secas à temperatura ambiente (25° C). As medidas foram realizadas com o espectrômetro de massas LT Microflex (Bruker Daltonics), usando software FlexControl (versão 3.0, Bruker Daltonics). Os espectros foram então importados para o software Biotyper (versão 2.0, Bruker Daltonics). Para caracterização físico química, as 2 amostras foram diluídas em solução padrão contendo 10 ml de óleo e 90 ml de água deionizada e feita aclimatação térmica por 10 minutos. Após estabilizada a amostra foi succionada até o bulbo do viscosímetro de tamanho número 200. Em seguida, o viscosímetro foi inserido no banho de viscosidade (BIOVERA BV).

**Resultados:**

Os valores das análises físico-químicas são apresentados na tabela 1 abaixo:

| | pH( fase aquosa) | °API | Densidade (g\cm3) | Viscosidade (mm²/s) |
|---|---|---|---|---|
| Amostra 1 | 7,64 | 41,4 | 0,8021 | 6,635 |
| Amostra 2 | 7,49 | 30,9 | 0,8527 | 116,2 |

Tabela 1 - características composicionais das amostras analisadas

A identificação das bactérias em aerobiose resultou em 2 linhagens distintas presentes na amostra: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum e Staphylococcus saprophyticus.*

**Discussão**

A espécie *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* é uma bactéria gram-negativa e pertence à classe *Actinobacteria* sendo caracterizada pelo metabolismo não fermentativo e lipofílica tipicamente compondo a flora bacteriana orofaríngea humana [5]. É o agente etiológico da difteria produzindo uma toxina que causa inflamação e febre em humanos. Uma cepa do mesmo gênero *Corynebacterium* e linhagem HRJ4 também já foi encontrada e isolada de solos contaminados em campos petrolíferos em Dagang – China e na província de Khorramshahr - Golfo Pérsico exibindo alta capacidade de tolerância ao sal e degradação de compostos de petróleo, em especial n-alcanos (C16, C18, C19, C26, C28) e misturas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos [6,7]. A tendência de crescimento observada por [8] é máxima em pH = 7,0, temperatura abaixo de 30 °C e 180 rpm. Esses dados corroboram com a taxa de crescimento observada nos resultados obtidos em nossos experimentos de cultivo com faixas de pH entre 7,49 e 7,64.



Figura 2 - Amostras em diferentes condições de aerobiose

Esses resultados, reforçam a necessidade de controle do pH do meio para aplicação dessa cepa específica em técnicas MEOR e sua potencial habilidade na degradação de hidrocarbonetos pesados. A espécie *Staphylococcus saprophyticus* é uma cepa coagulase-negativa aeróbia facultativa também patogênica representando um micro-organismo de impacto e importância na gestão de saúde pública. Principalmente em mulheres jovens, essa cepa causa infecções graves sendo a segunda maior causa de internações graves em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) e exibe grande afinidade pelos tecidos epiteliais do trato urinário feminino, mas na maioria dos casos é não-patogênica coexistindo sem causar doenças [9]. Essa espécie não é encontrada no ambiente marinho com grande abundância, mas curiosamente é a espécie que se destaca em crescimento quando há derramamentos de óleo próximos a costa e possui grande capacidade de degradação aeróbia de óleo pesado. Em recentes estudos foram encontradas grandes proporções dessa espécie em derramamentos de óleo próximos a costa, segundo demonstraram [10] a abundância dessa espécie salta de menos de 1% em locais não contaminados por óleo pesado para mais de 40% em locais próximos a costa contaminados com frações pesadas de óleo. De maneira interessante, é importante notar a evidente conexão entre o fato de zonas costeiras produzirem intensa emissão de efluentes domésticos não tratados, o que fatalmente alimenta a superfície da lâmina d´água costeira rica em oxigênio com essa espécie de bactéria. Associado a isso, a cepa exibe alta performance em degradar petróleo quando na presença de oxigênio, em especial frações pesadas C23, C24, C25 como mostram os achados do referido estudo, que são exibidos na figura 3 abaixo. Dessa forma, podemos candidatar essas frações como componentes preferenciais da amostra analisada neste estudo, e fica mais uma vez clara a importância de ensaios experimentais com cultivo para preencher as lacunas de desenvolvimento MEOR

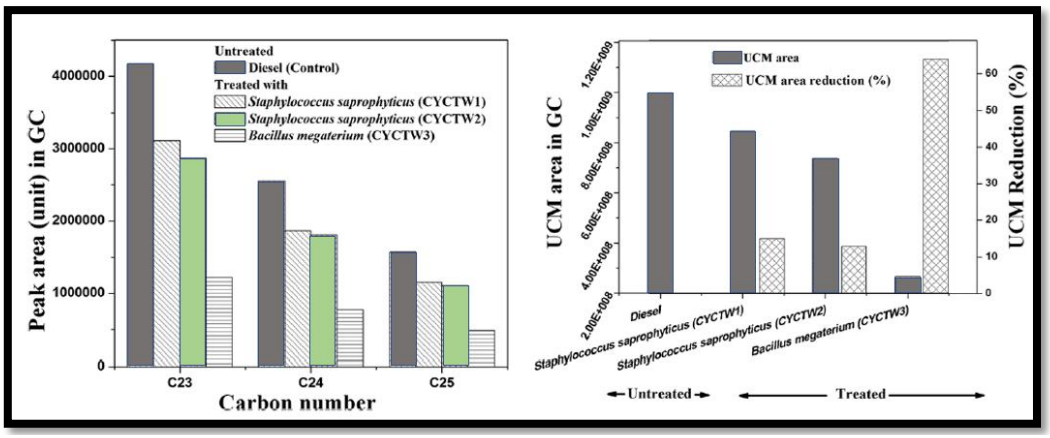



Figura 3 - a) Degradação de UCMs (mistura complexa não resolvida) (C24− e C24 +, dividida principalmente em duas partes e freqüentemente difícil de remover da mistura óleo-água) por isolados selvagens compostos por *Staphylococcus saprophyticus* (CYCTW1), *Staphylococcus saprophyticus* (CYCTW2) e *Bacillus megaterium* (CYCTW3). b) UCMs totais degradação / redução (área do cromatograma em GC %) em isolados selvagens compostos por *Staphylococcus saprophyticus* (CYCTW1), *Staphylococcus saprophyticus* (CYCTW2) e *Bacillus megaterium* (CYCTW3). (EXTRAÍDO de Maity *et al*, 2020)

## Conclusões

O presente trabalho demonstra claramente a possibilidade e potencial que as bactérias fornecem para aumentar a recuperação de petróleo pesado, pois ao consumir frações

pesadas diminui a densidade do óleo facilitando sua extração do reservatório. Dentre inúmeras vantagens se destacam a econômica e a ambiental o que faz dessa técnica um importante opção a ser considerada. Se melhor estudada e desenvolvida tem potencial para aumentar a recuperação de hidrocarbonetos que permanecem nos reservatórios mesmo após grandes esforços de engenharia em aplicações de técnicas avançadas de recuperação.

**Agradecimentos:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos ao Prof. Dr. Lúcio Leonel Barbosa do LabPetro (UNIFESP) por ceder equipamentos de laboratório.
**Aprovação Ética:** O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Analisou e Aprovou o protocolo utilizado no cultivo de bactérias deste estudo. Registro de relatório - CEP 9069270520.

## Referências

1. Zhang, J. Hui Gao & Quanhong Xue.; Potential applications of microbial enhanced oil recovery to heavy oil, Critical Reviews in Biotechnology, (2020). DOI: 10.1080/07388551.2020.1739618
2. Nikolova C And Gutierrez T. Use of Microorganisms in the Recovery of Oil from Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives. Front. Microbiol. (2020) 10:2996. doi: 10.3389/fmicb.2019.02996
3. Widder, S., Allen, R., Pfeiffer, T. et al. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. ISME J 10, 2557–2568 (2016). https://doi.org/10.1038/ismej.2016.45
4. Saravanan, P.; Pakshirajan, K.; Saha, Prabirkumar. Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor. Bioresource Technology, v. 99, n. 1, p. 205-209, 2008.
5. Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge Je; clinical microbiology of coryneform bacteria. 3rd, Bernard KA Clin Microbiol Rev. (1997) Jan; 10(1):125-59.
6. Hassanshahian, M., Et Al. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Mar. Pollut. Bull. (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.
7. ZHANG, H., ET AL., A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant Corynebacterium variabile HRJ4 and biochar, J. Environ. Sci. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.12.023
8. Hovelius B, Mårdh Pa. 1984. Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections. Rev. Infect. Dis. 6:328 –337. http:// dx.doi.org/10.1093/clinids/6.3.328.
9. Maity, J.P., Huang, Y., Lin, H. Et Al. Variation of Microbial Diversity in Catastrophic Oil Spill Area in Marine Ecosystem and Hydrocarbon Degradation of UCMs (Unresolved Complex Mixtures) by Marine Indigenous Bacteria. Appl. Biochem. Biotechnol. (2020). doi :10.1007/s12010-020-03335-5
10. Mcgenity, Terry; Van Der Meer, Jan Roelof; De Lorenzo, Victor. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin;: Springer, 2010.