



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA:
PETRÓLEO E MEIO AMBIENTE – POSPETRO**

ERICK DE AQUINO SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Pseudomonas* sp.
APLICADA À RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO**

Salvador
2022

ERICK DE AQUINO SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Pseudomonas* sp.
APLICADA À RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – Pospetro, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental.

Orientadores: Prof. Dr. Manoel Jerônimo Moreira Cruz
Prof. Dra. Danusia Ferreira Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira

Salvador
2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S237 Santos, Erick de Aquino

Avaliação do potencial de *Pseudomonas* sp. aplicado
a recuperação avançada de petróleo/ Erick de Aquino
Santos. – Salvador, 2022.

46 f.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jerônimo Moreira Cruz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da
Bahia. Instituto de Geociências, 2022.

1. Petróleo. 2. Biossurfactante. I. Cruz, Manoel
Jerônimo Moreira. II. Universidade Federal da Bahia. III.
Título.

CDU 604.2

Erick de Aquino Santos

SUBSTITUIR PELO ORIGINAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Pseudomonas* sp. APLICADA À
RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental, do Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (Pospetro), do Instituto de Geociências (IGEO) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Salvador, 01 de agosto de 2022.

Banca Examinadora

Manoel Jerônimo Moreira Cruz (Orientador)
Doutorado em Petrologia pela Université Pierre & Marie Curie, Paris VI., UPMC, França.
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Fábio Alexandre Chinalia
Doutorado em Environmental Microbiology. Pela University of Aberdeen, ABDN, Escócia.
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Karina Santos Garcia
Doutorado em Geociências pela Universidade Federal Fluminense - UFF – Brasil
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Regina Maria Geris dos Santos
Doutorado em Química, pela Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Marlos Gomes Martins
Doutorado em Biotecnologia (RENORBIO) pela Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil.
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Danusia Ferreira Lima
Doutorado em Geologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar os meus passos, pelo privilégio de ter sua presença e seu cuidado em cada lugar que vá e em todas as coisas que eu faça.

Sou grato à minha família que sempre me apoia e incentiva o meu crescimento pessoal e profissional, por tornar mais fáceis os voos sabendo que se tem onde pousar para descansar. Muito obrigado mãe Maria José, Pai Aliomar e minha irmã Jessica.

Agradeço aos meus amigos da vida que sempre são meu apoio para momentos difíceis de desabafo e por proporcionar momentos felizes que tornam a caminhada mais leve. Muito obrigado Deivid, Jonas, Jayelen, Fernanda, Cleverson, Bruna, Priscila, Vashtir, Vitória, Glícia, Matheus, Tâmara, Tainara, Juliano e Nyegirton.

Agradeço aos novos amigos e companheiros de jornada no POSPETRO com quem foi possível dividir um pouco da rotina, disciplinas, boas conversas, risadas. Muito obrigado Stefanie, Adriana, Naiana, Ayana e Ismael.

Àqueles que faziam parte da rotina diária de laboratório a quem sou grato por toda a ajuda, compartilhamento de ideias, troca de ensinamentos, muito obrigado Adonilson Neto, Bruna, Camila, Lavínia, Evelin, Isana, Mariana e Diego.

A o corpo técnico do Centro Excelência em Geoquímica, Petróleo, Energia e Meio Ambiente - LEPETRO por todo o auxílio e dedicação sempre que foi preciso; vocês fizeram tudo que era possível para contribuir com a realização desse trabalho. Muito obrigado Gisele, Sarah, Luciele, Liliane, Carol, Danilo e Lúcia.

Sou extremamente grato por ter tido a sorte de ser orientado pela professora Danusia que me acolheu como uma mãe no projeto GEOQPETROL - GEOMICRO e acreditou no meu potencial para desenvolver essa pesquisa e foi essencial para essa pesquisa com todo o seu comprometimento. Sou igualmente grato ao professor Eddy que também me acolheu como orientando e participou de todo esse processo sempre com instruções valiosas que contribuíram para a finalização dessa etapa. Agradeço também ao professor Manoel Jerônimo pelo apoio.

Obrigado à Shell Brasil pelo financiamento do projeto GEOQPETROL-GEOMICRO e pela concessão da bolsa que serviu de auxílio para o desenvolvimento de toda pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Um passarinho pediu a meu irmão para ser uma árvore.
Meu irmão aceitou de ser a árvore daquele passarinho.
No estágio de ser essa árvore, meu irmão aprendeu de sol,
de céu e de lua mais do que na escola.
No estágio de ser árvore meu irmão aprendeu para santo
mais do que os padres lhes ensinavam no internato.
Aprendeu com a natureza o perfume de Deus.
Seu olho no estágio de ser árvore aprendeu melhor o azul.
E descobriu que uma casa vazia de cigarra, esquecida no tronco
das árvores só serve para poesia.
No estágio de ser árvore meu irmão descobriu que as árvores
são vaidosas. Que justamente aquela árvore na qual meu irmão
se transformara, envaidecia-se quando era nomeada para o
entardecer dos pássaros e tinha ciúmes da brancura que os
lírios deixavam nos brejos.
Meu irmão agradecia a Deus aquela permanência em árvore
porque fez amizade com as borboletas.

Manoel de Barros

RESUMO

SANTOS, E. A. **Avaliação do Potencial de *Pseudomonas* sp. Aplicada a Recuperação Avançada de Petróleo**. 2022. 43f. Dissertação (Mestrado em geoquímica: petróleo e meio ambiente) – Universidade Federal da Bahia. 2022

A proposta deste trabalho foi avaliar a capacidade da bactéria *Pseudomonas* sp. na biotransformação de alcanos a fim de propor soluções sustentáveis que possam ser aplicadas na recuperação avançada de petróleo, além de determinar padrões de crescimento da cepa em condições extremas. Para isso o trabalho foi realizado em condições laboratoriais, inicialmente, com o fracionamento do petróleo bruto para obtenção da fração de saturados, utilizada no experimento. Foi também realizado teste de tolerância das bactérias a salinidade e a temperatura, para determinar as condições de montagem do experimento em relação a estes parâmetros. Adicionalmente, foi montado um experimento para produzir biossurfactante, através de bioestimulação. O experimento de biotransformação foi composto por uma triplicata com tratamento e um controle. Para tratamentos os erlenmeyrs receberam 100 mL de caldo contendo o biossurfactante, 10 g(10%) de NaCl, 3% da cepa e 1% da fração de saturados. Os erlenmeyrs foram incubados a 40 °C e 180 rpm por 18 dias com análises periódicas. Como resultados foram observados inicialmente a tolerância das bactérias que tiveram melhor desempenho para a temperatura de 40° C e não houve alteração significativa para as diferentes salinidades, sendo um parâmetro não limitante. Para o experimento final o crescimento bacteriano analisado por O.D. teve uma baixa variação com menor ponto no T18 apresentando absorvância de 0,115 e o maior ponto no T6 com absorvância 0,149. Para a análise da população bacteriana através de qPCR o padrão encontrado se mostra similar aos resultados de densidade óptica, com baixa variação sendo encontrado o menor número de cópias do gene 16S rRNA $6,66 \times 10^3$ no T0 e maior número foi no T12 com número de cópias $7,86 \times 10^3$. Para análise da biotransformação o tempo 6 foi observado com maior taxa sendo de 54% de recuperação do óleo (C30), seguida de 52% (C31) e 51% (C29).

Palavras-chave: MEOR, biotransformação, biossurfactante, alcanos, qPCR.

ABSTRACT

SANTOS, E. A. **Evaluation of *Pseudomonas* sp. Applied to Advanced Oil Recovery.** 2022. 43f. Dissertation (Master's in geochemistry: petroleum and the environment) – Federal University of Bahia. 2022

The purpose of this work was to evaluate the ability of the bacterium *Pseudomonas* sp. in the biotransformation of alkanes in order to propose sustainable solutions that can be applied in advanced oil recovery, in addition to determining strain growth patterns under extreme conditions. For this, the work was carried out under laboratory conditions, initially, with the fractionation of crude oil to obtain the saturated fraction, used in the experiment. The bacteria tolerance test to salinity and temperature was also carried out to determine the conditions for setting up the experiment in relation to these parameters. Additionally, an experiment was set up to produce biosurfactant, through biostimulation. The biotransformation experiment consisted of a triplicate with treatment and a control. For treatments, erlenmeyers received 100 mL of broth containing the biosurfactant, 10 g (10%) of NaCl, 3% of the strain and 1% of the saturated fraction. Erlenmeyers were incubated at 40 °C and 180 rpm for 18 days with periodic analysis. As results were initially observed the tolerance of bacteria that had better performance for the temperature of 40° C and there was no significant change for the different salinities, being a non-limiting parameter. For the final experiment the bacterial growth analyzed by O.D. had a low variation with the lowest point in T18 with absorbance of 0.115 and the highest point in T6 with absorbance of 0.149. For the analysis of the bacterial population through qPCR, the pattern found is similar to the optical density results, with low variation, with the lowest number of copies of the 16S rRNA gene 6.66×10^3 being found in T0 and the highest number was in T12 with number of copies 7.86×10^3 . For biotransformation analysis, time 6 was observed with the highest rate, being 54% of oil recovery (C30), followed by 52% (C31) and 51% (C29).

Keywords: MEOR, biotransformation, biosurfactant, alkanes, qPCR.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.2 | OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE SATURADOS | 17 |
| 3.3 | CULTIVO DA <i>Pseudomonas</i> sp. | 18 |
| 3.4 | EXPERIMENTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO | 18 |
| 3.5 | APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS | 19 |
| 4 | MICROBIAL ENHANCED OIL RECOVERY POR <i>Pseudomonas</i> sp. SOB CONDIÇÕES LABORATORIAIS | 20 |
| 4.1 | RESUMO | 20 |
| 4.2 | ABSTRACT | 20 |
| 4.3 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 4.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4.4.1 | FRACIONAMENTO DO PETRÓLEO PARAFÍNICO | 24 |
| 4.4.2 | PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE | 25 |
| 4.4.3 | TESTE DE TOLERÂNCIAS SOB CONDIÇÕES DE SALINIDADE E TEMPERATURA | 26 |
| 4.4.4 | PREPARO DA CULTURA BACTERIANA | 26 |
| 4.4.5 | MONTAGEM DO EXPERIMENTO | 26 |
| 4.4.6 | ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO E QUANTIFICAÇÃO GENÉTICA | 27 |
| 4.4.7 | EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE ALCANOS | 28 |
| 4.5 | RESULTADO E DISCUSSÃO | 28 |
| 4.5.1 | ISOLAMENTO E PUREZA DO DNA | 28 |
| 4.5.2 | EFEITO DA SALINIDADE E TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DA CEPA | 30 |
| 4.5.3 | CARACTERÍSTICAS DO CRESCIMENTO BACTERIANO | 31 |
| 4.5.4 | QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE 16S rRNA POR qPCR | 32 |
| 4.5.5 | BIOTRANSFORMAÇÃO DOS ALCANOS | 33 |
| 4.6 | CONCLUSÕES | 40 |
| 4.7 | AGRADECIMENTOS | 40 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 42 |

1 INTRODUÇÃO

Existe uma estimativa apontando que o crescimento populacional alcançará até 2050 um total de 9,5 bilhões de habitantes na terra. Isso implica diretamente na relação com a demanda energética que será exigida, diante dos padrões de vida (TATAR, 2018). Nesse contexto de necessidade energética, o petróleo e gás ainda se configuram como sendo as principais fontes primárias no mundo, fazendo com que haja um exigente aumento na produção de petróleo e gás (CÂMARA et al., 2019; SHE *et al.*, 2019).

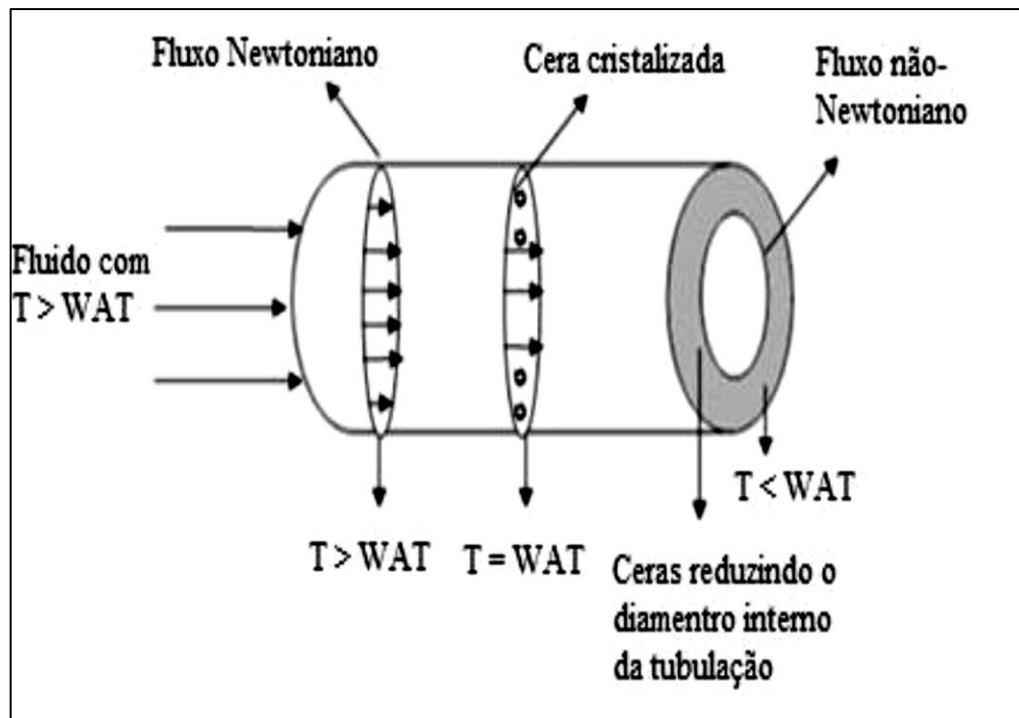
O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que contém diferentes compostos orgânicos como: parafinas, aromáticos, naftenos, resinas e asfaltenos. Entre esses grupos de hidrocarbonetos, as parafinas de alto peso molecular e asfaltenos são responsáveis por problemas encontrados durante a produção, transporte e processamento desses fluidos complexos (ALVES, 2017).

As parafinas lineares (*n*-parafina) e as parafinas ramificadas (isoparafinas) fazem parte da classe dos hidrocarbonetos saturados (TISSOT, 1984; PETERS et al., 2005). Em óleos brutos leves os componentes mais abundantes, geralmente, são a *n*-parafina e extensivos estudos sobre seu comportamento têm sido realizados (DUTTA, 2001).

O comportamento de deposição das parafinas possui uma relação com a redução da temperatura que causa uma diminuição na fluidez do composto, o nível de temperatura se torna crítico quando está abaixo da temperatura de aparência da cera (WAT) que resulta na sua deposição (Figura 1), conseqüentemente diminuindo a seção transversal do fluxo. Essa redução de temperatura também pode gerar a cristalização da cera, de acordo com a extensão dessa rede de cristais pode diminuir a viscosidade do óleo alcançando a gelificação (PHAN et al., 2019).

Para determinar uma garantia de escoamento do petróleo parafínico na tubulação, é importante determinar duas importantes propriedades: *Wax Appearance Temperature* (WAT)/Temperatura Inicial de Aparecimento de Cristais (TIAC) e *Pour Point*/Ponto de Fluidez (PP). A WAX infere acerca do início de precipitação das parafinas para formação de cristais e a PP corresponde à temperatura acima, em que há o escoamento do petróleo parafínico (ALVES, 2017).

Figura 1 - Deposição da cera na tubulação de extração do petróleo, de acordo com a WAT



Fonte: Sakthipriya, 2017.

O estudo de garantia de fluxo para esses sistemas geralmente exige a medição de pelo menos duas propriedades essenciais do petróleo, o WAT e o PP; outra propriedade de petróleo bruto de interesse é a força do gel. Usando o WAT e PP, o comportamento reológico e problemático de um petróleo bruto ceroso pode ser mapeado em 3 regiões em uma escala de temperatura (KARAN et al., 2000):

1. Uma região definida pelas temperaturas acima do WAT, onde o fluido atua como um fluido newtoniano e não há risco de deposição de cera;
2. Uma região definida por temperaturas abaixo do PP, onde o fluido exibe um comportamento altamente não newtoniano e onde o óleo pode gelificar sob condições de repouso;
3. Uma região de comportamento levemente não newtoniano definido pelas temperaturas entre o WAT e o PP.

Além da pressão e da temperatura, a deposição de cera também depende da densidade do petróleo bruto (ALOMAIR et al., 2014). A densidade do óleo pode ser alterada transformando as parafinas de alto peso molecular em parafinas de baixo peso molecular e reduzindo o peso molecular aparente. Geralmente, as técnicas

empregadas para solucionar a deposição de ceras são aparatos químicos, térmicos e mecânicos. A empregabilidade dessas técnicas tem um potencial para gerar danos aos dutos, como no método térmico que pode gerar uma concentração de porções pesadas do óleo bruto e parafina (AL-YAARI, 2011).

Os processos que são aplicados de maneira inicial para produção de petróleo são referenciados como primário e secundário e possui como alcance de extração uma taxa em torno de 33% de todo o óleo original presente no reservatório, o restante (67%) fica retido nos poros das rochas reservatório, geralmente, por forças viscosas ou capilares (YERNAZAROVA et al., 2016).

De maneira complementar aos estágios primário e secundário, a recuperação do óleo remanescente se dá através da aplicação de técnicas terciárias, ou a chamada EOR (*Enhanced Oil Recovery*) (GBADAMOSI, et al. 2019). A EOR consiste na introdução de produtos químicos como surfactantes, emulsificantes, polímeros, ácidos, dispersantes e solventes. Sua aplicação se iniciou de forma combinada com as técnicas de recuperação secundária, em campos de petróleo, abandonados após a retirada dos 30% de óleo, a fim de melhorar o rendimento do petróleo bruto (PATEL et al., 2015).

As frações de óleo que ao longo do tempo são facilmente produzidas, sempre foram extraídas através dos métodos convencionais, técnicas que são conhecidas como recuperação primária e recuperação secundária de óleo. Porém, a fração pesada do óleo cru apresenta uma resistência na remoção por essas técnicas, sendo os fatores atribuídos, principalmente, aos parâmetros de densidade, viscosidade e gravidade específica elevada (MUZZAFARUDDIN, 2019).

Para tanto, métodos de recuperação avançada de óleo (EOR) têm sido desenvolvidos tendo como um dos principais objetivos reduzir a viscosidade do óleo a fim de aumentar a eficiência de recuperação. Assim, a recuperação de óleo passa a se configurar três em fases: primária, secundária e terciária. No método primário é relatada a taxa de extração em 10%, para a secundária a taxa pode chegar a 40%. Porém, com a EOR a taxa atinge em torno de 60% de recuperação (MUZZAFARUDDIN, 2019).

A *Society Petroleum Engineers* (SPE) define a EOR como um ou mais de uma variedade de processos que buscam melhorar a recuperação de hidrocarbonetos de um reservatório após a fase de produção primária. Adicionalmente, Satter *et al.* (2008) infere que o método consiste em processos que

vão além da recuperação secundária, em que se utiliza de mecanismo de inundação ou injeção de gás natural, incluindo todos os métodos que usam fontes externas de energia e/ou material para recuperação de óleo (ALVARADO, 2010).

A EOR se apresenta através da aplicação de três principais métodos, são eles: termal, químico e gás. O método termal possui técnicas como injeção de vapor cíclico (*Huff & Puff*) que é empregado em óleo pesado ou extrapesado. O método químico apresenta como técnica principal a inundação com polímeros e o método de gás com aplicação de elementos como o CO₂, sendo amplamente empregado em reservatório de óleos leves (ALVARADO, 2010).

Apesar de ser inicialmente conhecida como método terciário, a recuperação avançada não necessariamente tem sua aplicabilidade após a ação de recuperação primária e secundária. Como exemplo disso é possível citar os reservatórios que possuem óleo mais pesado e com alta viscosidade, talvez, o método secundário seja inviável com seu mecanismo de produção, requerendo logo após o método primário, a aplicação de EOR (MUSSE, 2009).

A recuperação avançada de óleo foi assim denominada para retirar a ideia sequencial em que sua ação seria possível apenas na fase terciária. Em razão de ser definida como um conjunto de tecnologias de produção que envolve a injeção de energia ou fluidos para melhorar a recuperação de óleo, a EOR pode ser aplicada em qualquer fase de produção (primária, secundária ou terciária) (ALVARADO, 2010).

Logo, o desenvolvimento dessas tecnologias passou a mudar o enfoque da indústria de petróleo, em que, não se busca tanto por novos locais de perfuração nos reservatórios, podemos citar como exemplo, o Cazaquistão. Além desse exemplo, diversos países têm implementado as tecnologias em poços que posteriormente eram considerados de difícil obtenção de óleo, após recuperação secundária, e passam a dar prioridade na implementação da EOR (YERNAZAROVA, 2016).

O método tem seu sucesso atribuído ao estudo prévio a aplicação, levando em consideração sua adequação ao reservatório específico, eficiência de recuperação, disponibilidade de fluidos injetáveis e custo, pois apresenta riscos significativos na sua execução como a corrosão do poço e equipamentos a partir aplicação de CO₂ (SATTER et al., 2016).

Além dos riscos dentro do próprio processo, o custo de implantação de algumas técnicas é bastante elevado, como pode ser novamente aplicado o exemplo do uso do CO₂. Adicionalmente existe a utilização de compostos químicos considerados tóxicos, podendo trazer diversos prejuízos a quem os manipula, bem como ao meio ambiente, principalmente quando presentes no óleo (PATEL, 2015).

Apesar de todos os benefícios agregados pela recuperação avançada, os riscos apresentados mostraram a necessidade em dar atenção a técnicas ambientalmente sustentáveis e com custo mais viável. Então, muitas pesquisas passaram a se dedicar a implementação de microrganismos e dos produtos microbianos, relação que foi feita pela primeira vez em 1926. Com isso, a recuperação microbiana avançada de óleo passou a ser um importante tópico de aplicação da biotecnologia na solução dos problemas apresentados pela indústria (PATEL, 2015).

A concepção de implementar microrganismos na recuperação avançada de óleo, ocorreu pela primeira vez no ano de 1926, com J. W. Beckman (BECKMAN, 1926). Ele viu a necessidade de aumentar a taxa de recuperação atingida através dos processos já existentes de recuperação de óleo: primária e secundária. Mas só no ano de 1946 através da C. E. ZoBell houve a obtenção do primeiro registro de patente, a partir da validação de muitos estudos e testes de campo com resultados considerados relevantes (YERNAZAROVA, 2016).

Posteriormente, entre os anos de 1970 até 2000 os estudos dentro da recuperação microbiana avançada de óleo ou MEOR, sua sigla em inglês, como é usualmente referido, se aprofundaram no conhecimento acerca da ecologia microbiana. Paralelamente a estes estudos era feita a caracterização dos depósitos de petróleo relacionados a essa tecnologia. Em 2007 a análise dos estudos nos EUA apresentou uma taxa de sucesso alcançado com a utilização de MEOR correspondente a 78%. Além disso, não foram registrados números de redução na recuperação de óleo a partir da aplicação da técnica (YERNAZAROVA, 2016).

Embora, como mencionada, seja uma das tecnologias EOR mais antigas, o método não foi documentado com tanto sucesso quanto outras técnicas EOR. Isso ocorreu, principalmente, devido aos diferentes graus de sucesso obtidos em laboratório, bem como a falta de dados e falhas que ocorreram no aumento de escala dos testes de campo. A tecnologia passou a ter sua importância reconhecida

a partir do conhecimento adquirido sobre os produtos e processos microbianos (KARIMI et al., 2012).

Avaliar o potencial da *Pseudomonas* sp. na modificação de compostos do petróleo saturados, melhorando a sua recuperação e aumentando o valor agregado do produto final, é a grande justificativa dessa pesquisa. Além de contribuir para o uso de tecnologias sustentáveis, diminuindo os impactos secundários gerados pelas técnicas convencionais.

2 OBJETIVOS

Estão descritos neste tópico os objetivos geral e específicos do trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Reportar o potencial da bactéria *Pseudomonas* sp. na biotransformação de alcanos de alta massa molecular em baixo peso molecular como ferramenta para recuperação avançada de petróleo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a biotransformação dos alcanos por *Pseudomonas* sp. ao longo de tempo, através de cromatografia gasosa - GC-FID;
- ✓ determinar condições de temperatura e salinidade ótimas para a sobrevivência do microrganismo;
- ✓ avaliar o crescimento celular microbiano ao longo do tempo de experimento, em condições aeróbicas;
- ✓ obter a quantificação absoluta do 16S *rRNA* correlacionando com a quantificação do crescimento bacteriano;
- ✓ produzir biossurfactante através da bioestimulação da *Pseudomonas* sp em meio de cultivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para elaboração deste trabalho inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico, para acessar os principais documentos referentes ao tema foram utilizadas as plataformas: Portal Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Google Acadêmico, *Scientific Eletronic Library Online* (SciELO) e Portal de Periódicos da Universidade Federal da Bahia. Diante da diversidade de documentos abrigados nos bancos de dados, foram aplicadas palavras-chave combinadas com operadores booleanos a fim de encontrar os arquivos mais específicos dentro da proposta do trabalho. Entre os termos de busca foram utilizados: MEOR OR EOR, biotransformation AND crude oil, oil recovery AND microbiol*, biodegradation AND MEOR e Microbial Enhanced Oil Recovery.

O levantamento obtido através dos métodos de pesquisa aplicado contribuiu para o embasamento teórico do projeto, bem como estudo e aplicação de metodologias, auxílio analítico ao longo das etapas de execução dos processos.

3.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE SATURADOS

Como etapa inicial foi aplicada metodologia que tem como objetivo fracionar o petróleo da Bacia do Recôncavo nas principais frações: compostos saturados, compostos aromáticos e compostos polares (NSO), através da cromatografia líquida a vácuo (LIMA, 2010). Para este trabalho só utilizamos a fração saturada (*n*-parafinas), que foi submetida à ação da *Pseudomonas* sp. em condições aeróbicas. O Petróleo utilizado para o fracionamento foi cedido pela operadora independente de exploração e produção de petróleo e gás *onshore* Petrorecôncavo, Campo: Norte Fazenda Caruaçu – Bacia do Recôncavo, Profundidade: 1064,0m, Densidade @ 20°C: 0,8371 e °API @ 20°C: 37,36.

3.3 CULTIVO DA *Pseudomonas* sp.

A cepa bacteriana de *Pseudomonas* sp. avaliada nesta pesquisa faz parte de um consórcio formado por 10 bactérias e 24 fungos filamentosos protegidos pela patente de Lima et al. (2021), cujo número de depósito no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) é BR 10 2021 002341 4. O cultivo da cepa de *Pseudomonas* sp. foi realizado inicialmente cultivada em meio LB (Luria Bertani) sob diferentes concentrações de salinidade (3%, 5%, 8% e 10%) e diferentes temperaturas (25 °C, 40 °C e 60 °C) para determinar as melhores condições de montagem dos tratamentos.

3.4 EXPERIMENTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

O experimento de biotransformação foi constituído de duas condições: a fração saturada na presença da *Pseudomonas* sp e a fração saturada na ausência da *Pseudomonas* sp. O teste foi conduzido com triplicatas biológicas e um branco para cada tempo de amostragem, totalizando 16 amostras. O estudo da biotransformação foram montados em erlenmeyers, que consistiu na adição de alíquota de 3 mL da solução da *Pseudomonas* sp. padronizada com $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL e transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo de (caldo de biossurfactantes) e 1 mL ($\pm 0,3032$ g) de fração. Os erlenmeyers foram condicionados a incubadora shaker orbital (Jeio Tech TM) a 180 rpm e 40 °C e eram retirados 4 frascos (1 branco e a triplicata amostral) correspondendo a cada tempo determinado: T0, T6, T12 e T18. Os frascos tinham seu conteúdo centrifugado para retirada de material microbiológico e em seguida passavam pela etapa de extração líquido-líquido para obtenção da fração, analisada através de cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA).

Com a massa celular da centrifugação foi conduzido o processo de extração de DNA através do kit comercial da Norgen Biotek Corp. TM e quantificação do material extraído por Nanodrop TM ND-2000 UV-Vis. O objetivo final, a partir disso,

foi realizar a quantificação absoluta do gene *16S rRNA* através da utilização da técnica de qPCR.

3.5 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os principais resultados dessa pesquisa foram apresentados em forma de um artigo intitulado “MICROBIAL ENHANCED OIL RECOVERY POR *Pseudomonas* sp. SOB CONDIÇÕES LABORATORIAIS”

4 MICROBIAL ENHANCED OIL RECOVERY POR *Pseudomonas* sp. SOB CONDIÇÕES LABORATORIAIS

4.1 RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar a capacidade da bactéria *Pseudomonas* sp. na biotransformação de alcanos a fim de propor soluções sustentáveis que possam ser aplicadas na recuperação avançada de petróleo, além de determinar padrões de crescimento da cepa em condições extremas. Para isso o trabalho foi realizado em condições laboratoriais, inicialmente, com o fracionamento do petróleo bruto para obtenção da fração de saturados, utilizada no experimento. Foi também realizado teste de tolerância das bactérias a salinidade e a temperatura, para determinar as condições de montagem do experimento em relação a estes parâmetros. Adicionalmente, foi montado um experimento para produzir biossurfactante, através de bioestimulação. O experimento de biotransformação foi composto por uma triplicata com tratamento e um controle. Para tratamentos, os erlenmeyrs receberam 100 mL de caldo contendo o biossurfactante, 10 g(10%) de NaCl, 3% da cepa e 1% da fração de saturados. Os erlenmeyrs foram incubados a 40 °C e 180 rpm por 18 dias com análises periódicas. Como resultados foram observados inicialmente a tolerância das bactérias que tiveram melhor desempenho para a temperatura de 40° C e não houve alteração significativa para as diferentes salinidades, sendo um parâmetro não limitante. Para o experimento final o crescimento bacteriano analisado por O.D. teve uma baixa variação com menor ponto no T18 apresentando absorvância de 0,115 e o maior ponto no T6 com absorvância 0,149. Para a análise da população bacteriana através de qPCR o padrão encontrado se mostra similar aos resultados de densidade óptica, com baixa variação sendo encontrado o menor número de cópias do gene 16S rRNA $6,66 \times 10^3$ no T0 e maior número foi no T12 com número de cópias $7,86 \times 10^3$. Para análise da biotransformação o tempo 6 foi observado com maior taxa sendo de 54% de recuperação do óleo (C30), seguida de 52% (C31) e 51% (C29).

Palavra- chave: MEOR, biotransformação, biossurfactante, alcanos, qPCR.

4.2 ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the ability of the bacterium *Pseudomonas* sp. in the biotransformation of alkanes in order to propose sustainable solutions that can be applied in advanced oil recovery, in addition to determining strain growth patterns under extreme conditions. For this, the work was carried out under laboratory conditions, initially, with the fractionation of crude oil to obtain the saturated fraction, used in the experiment. The bacteria tolerance test to salinity and temperature was also carried out to determine the conditions for setting up the experiment in relation to these parameters. Additionally, an experiment was set up to produce biosurfactant, through biostimulation. The biotransformation experiment consisted of a triplicate with treatment and a control. For treatments, erlenmeyrs received 100 mL of broth containing the biosurfactant, 10 g (10%) of NaCl, 3% of the

strain and 1% of the saturated fraction. Erlenmeyers were incubated at 40 °C and 180 rpm for 18 days with periodic analysis. As results were initially observed the tolerance of bacteria that had better performance for the temperature of 40° C and there was no significant change for the different salinities, being a non-limiting parameter. For the final experiment the bacterial growth analyzed by O.D. had a low variation with the lowest point in T18 with absorbance of 0.115 and the highest point in T6 with absorbance of 0.149. For the analysis of the bacterial population through qPCR, the pattern found is similar to the optical density results, with low variation, with the lowest number of copies of the 16S rRNA gene 6.66×10^3 being found in T0 and the highest number was in T12 with number of copies 7.86×10^3 . For biotransformation analysis, time 6 was observed with the highest rate, being 54% of oil recovery (C30), followed by 52% (C31) and 51% (C29).

Keywords: MEOR, biotransfomation, biosurfactant, alkanes, qPCR.

4.3 INTRODUÇÃO

A recuperação microbiana avançada de óleo (MEOR) se estabeleceu como a estratégia terciária na recuperação de óleo. Para tanto, se utiliza da manipulação de microrganismos e seus produtos metabólicos bem documentados, como por exemplo: biopolímeros, biossurfactantes, ácidos orgânicos, biomassa e biogás. Essas substâncias possuem a capacidade de alterar as propriedades da mistura de água de formação, óleo e gás, bem como alterar as propriedades da matriz do reservatório desempenhando um papel significativo na recuperação de óleo residual (YOUSSEF et al., 2009; GOODMAN, 2017).

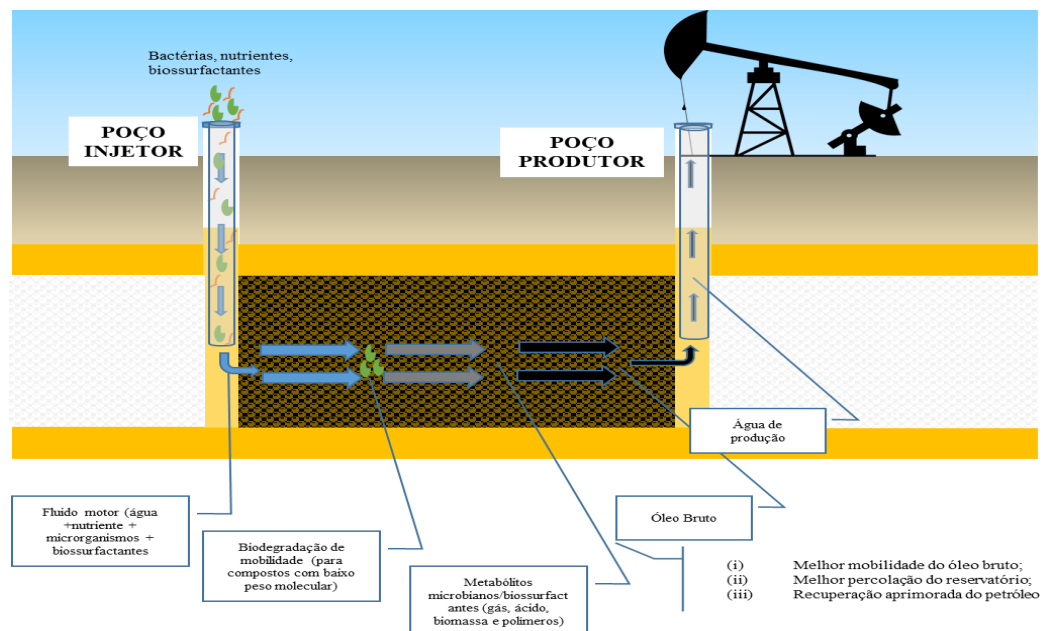
Os mecanismos da MEOR (Figura 2) são diferentes dos mecanismos obtidos de outros métodos de recuperação química avançada de óleo (EOR), pois trata da injeção direta de microrganismos vivos e dos seus bioprodutos. É considerado um método ecológico, pois não envolve utilização de produtos químicos tóxicos além de ser um método viável devido sua aplicação não necessitar de modificações nas instalações de injeção de água existente. Além disso, os microrganismos são capazes de metabolizar diferentes hidrocarbonetos em diferentes taxas (YERNAZAROVA, 2016; SHIBUAL et al., 2018).

Atualmente, há um interesse crescente na aplicação de MEOR para aumentar a produção de óleo em reservatórios esgotados, devido ao seu baixo custo de capital e respeito ao meio ambiente, devido seus produtos microbianos

apresentarem uma baixa toxicidade e serem biodegradáveis no ambiente (SHIBULAL et al., 2014; YERNAZAROVA, 2016).

A metodologia de MEOR pode ser classificada em dois processos. O primeiro é conhecido por bioaugmentação, que consiste na adição de bactérias que possuem uma alta capacidade de sobrevivência em condições extremas, como são as condições do poço, a esse grupo é dado o nome de alóctones, suportam, por exemplo, alta temperatura e salinidade. Juntamente a essas bactérias são adicionados os nutrientes necessários para auxiliar o seu crescimento nesse ambiente (crescimento microbiano *ex-situ*) (GOODMAN, 2017).

Figura 2 - Diagrama dos mecanismos de MEOR



Fonte: Adaptado de SHE, 2019.

O segundo processo, conhecido como bioestimulação, se dá através da injeção de nutrientes para estimular o crescimento das bactérias indígenas, que são naturais desse ambiente. Esse processo tem se sobressaído devido às condições apresentadas pelas bactérias indígenas serem mais aptas à sobrevivência nos diversos parâmetros ambientais (GOODMAN, 2017).

A atuação dos microrganismos nos diferentes reservatórios ainda é um campo bastante estudado, mesmo diante da descoberta de diversas substâncias produzidas e das suas ações. Infere-se que o efeito causado por esses organismos

na rocha, seja o resultado de uma combinação de atuações para obter a fluidez do óleo (HALIM, 2015).

Os principais mecanismos realizados pelos microrganismos na MEOR são sumariamente a formação de alguns bioácidos capazes de dissolver determinados minerais, a produção de solventes e biogases auxiliando na diminuição da viscosidade do óleo, formação de biossurfactantes, biopolímeros e outros compostos capazes de causar emulsificação no óleo, bem como a produção de biomassa influenciando na molhabilidade na rocha (YERNAZAROVA, 2016; CHAFALE, 2022).

O processo de biotransformação no contexto de MEOR surgiu posteriormente, sendo sugerida como um dos métodos mais promissores, pela qual a viscosidade do óleo e o ponto de congelamento são reduzidos, o que por sua vez aumentará o fluxo do óleo. Isso traz novas perspectivas diante das características que implicam diretamente na recuperação dos óleos pesados, como o ponto de congelamento, baixa capacidade de fluxo, difícil recuperação de óleo e alto custo de recuperação (SHIBULAL, 2014).

A ação transformadora dos microrganismos no petróleo conduz a redução das cadeias mais longas dos hidrocarbonetos, gerando um óleo mais fluido e leve (WENTZEL *et al.*, 2007). Isso ocorre devido a ação resultar em alteração nas propriedades físicas do óleo, de maneira fundamental. A biodegradação possui duas principais vias: via aeróbica e anaeróbica, em que há presença de oxigênio e ausência do elemento, respectivamente. A biodegradação que ocorre em hidrocarbonetos nos reservatórios é do tipo anaeróbica (AITKEN *et al.*, 2004; NIU *et al.*, 2020).

Os estudos do processo de biotransformação anaeróbica têm objetivado aumentar o nível de conhecimento acerca da bioquímica dos microrganismos através da identificação dos metabólitos e descrição dos principais genes envolvidos nesse processo. Nessas condições, os tipos de hidrocarbonetos que sofrem ação transformadora são: hidrocarbonetos, como benzeno, naftaleno, asfalteno, fenantreno, alcano e hidrocarbonetos misturados, sendo a degradação de alcanos a mais promissora (NIU *et al.*, 2020).

A condição aeróbica é menos prevalente. Sua descrição é tipicamente relacionada a aplicação de oxigênio na forma dissolvido, tendo o mesmo objetivo de facilitar a retirada do óleo e se dá por meio de injeção do fluido conduzindo a

remoção de parafinas depositadas no poço, tanque de armazenamento e ao longo do ducto de coleta (NAZINA, et al., 2007).

Uma das questões importantes sobre a biotransformação em condições *in-situ* é que essa ação ocorre principalmente na interface óleo-água, e pelo fator hidrofóbico do óleo há um comprometimento do mecanismo (TIAN *et al.*, 2000). Em relação a essa problemática, estudos inferem que a emulsificação do óleo gera uma maior área de contato para que as células microbianas sejam capazes de realizar adsorção e transformação do óleo, sendo os biossurfactantes importantes elementos para gerar a emulsificação (RICOMARTÍNEZ *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2017).

Bactérias do gênero *Pseudomonas*, tem seus estudos bem relatados relacionados a biodegradação/biotransformação de óleo para estudo de MEOR. Adicionalmente, é reportada sua capacidade em produzir biossurfactante. Em 1995, Banat realizou uma pesquisa utilizando *Pseudomonas fluorescens* avaliando a degradação em frações de *n*-alcanos de tamanhos C12-C32. Em 2007, Hasanuzzaman e colaboradores avaliaram a capacidade da *Pseudomonas aeruginosa* em frações de tamanho C36-C40. Ambos os estudos demonstrando uso promissor no gênero bacteriano, diante dos resultados satisfatórios (NIU *et al.*, 2020).

No presente estudo foi avaliado potencial da bactéria *Pseudomonas* sp. em atuar sobre cadeias mais pesadas de alcanos realizando biotransformação gerando cadeias mais leves.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item estão descritos os processos metodológicos utilizados a fim de alcançar o objetivo proposto pelo trabalho.

4.4.1 FRACIONAMENTO DO PETRÓLEO PARAFÍNICO

Para o fracionamento a vácuo foi realizado a montagem do aparato que consiste em um sistema composto de um extrator aberto, em vidro com placa perfurada Ø 1 Mm e junta esmerilhada cônica com saída para vácuo em boro acoplado a um balão de fundo redondo, e bomba a vácuo. Ao funil depositou-se na

sua extremidade inferior um chumaço de lã de vidro com a finalidade de vedar os furos e impedir a passagem de partículas da fase estacionária (gel de sílica 0,063-0,200 mm). Colocou-se uma membrana fibra de vidro com diâmetro 47 mm. Foi adicionado aproximadamente 50g de gel de sílica. Posteriormente transferiu-se 0,2 g de amostra (a amostra é misturada com um pouco de sílica antes de ser transferida para o sistema) para o sistema, e para que esta não crie caminhos preferenciais durante a eluição do solvente, utilizou-se um chumaço de algodão sobre a amostra.

Aos poucos e de forma contínua foram adicionados 120 mL de n-hexano ao sistema para eluir os compostos saturados (F1), sendo que inicialmente foi colocado um pouco do solvente no sistema, a bomba de vácuo foi acionada para que os compostos desçam uniformemente e posteriormente adicionado o restante do solvente. Entre a primeira fração e a segunda fração foi eluido, pela coluna, 100 mL de n-hexano a fim de remover possíveis resquícios de compostos saturados que poderiam estar retidos na sílica, intitulada de fase “morta”.

Posteriormente foram eluidos os compostos aromáticos (F2) com uma mistura de dois solventes, 120 mL de hexano + diclorometano (DCM) na proporção de 4:1. O processo de fracionamento segue o mesmo padrão da fração de saturados (F1). Entre a F2 e a F3 será eluido pela coluna 60 mL da mistura de n-hexano e DCM a fim de remover possíveis resquícios de compostos aromáticos que poderão estar retidos na sílica, evitando assim a contaminação da próxima fração.

E para eluir os compostos polares (F3) (NSO) foram utilizados uma mistura de 120 mL de DCM + metanol com uma proporção de 4:1 utilizando o mesmo procedimento descrito acima.

4.4.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Em 4 erlenmeyers contendo em cada um 100 mL de solução de NaCl, meio de cultivo BH (Bushell Haas) a 3% e glucose (dextrose) a 1%, sendo por fim foi inoculada a cepa de *Pseudomonas* sp. Posteriormente os frascos forma incubados em *Shaker* (Lab Companion™) nas condições de 180 rpm e 37 ° C de temperatura por um período de 4 dias. Após o período foi realizada a etapa de retirada da massa celular do microrganismo através de centrifugação seguido de filtragem a vácuo com

membrana de filtração e o caldo sobrenadante contendo o biossurfactante foi utilizado para montagem do experimento.

4.4.3 TESTE DE TOLERÂNCIA SOB CONDIÇÕES DE SALINIDADE E TEMPERATURA

A cepa foi cultivada em meio LB e aliqüotada em 12 erlenmeyers, onde esses frascos possuíam 100 mL de solução salina nas concentrações de 3%, 5%, 8% e 10% e as temperaturas foram de 25 °C, 40 °C e 60 °C. Assim, cada incubadora recebeu 4 frascos com as diferentes salinidades mais a cepa e 4 frascos apenas com solução salina (controle) totalizando 8 erlenmeyer para cada temperatura, durante o período de 15 dias com análises nos dias: 0, 7 e 15.

4.4.4 PREPARO DA CULTURA BACTERIANA

Em 4 erlenmeyers contendo 200 mL de meio mineral BH a 3% foi inoculado a cepa de *Pseudomonas* sp. e os frascos foram incubados em *Shaker* (Lab Companion™) nas condições de 150 rpm a 37 °C de temperatura por um período de 3 dias. Após o período a massa microbiana foi obtida a partir de centrifugação para posteriormente ser quantificada e adicionada ao experimento final.

4.4.5 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

Foram montados 5 erlenmeyers (B1, B2, A1, A2 e A3) para 4 tempos (T0, T6, T12 e T18) de avaliação, totalizando 20 erlenmeyers. Os frascos identificados como A são as amostras em triplicatas que continham 100 mL do caldo contendo biossurfactante, 10% de NaCl, 3% de cepa *Pseudomonas* sp. ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e 1% de fração de saturados (F1). Para o B1 foi seguido o mesmo padrão, mas sem a adição da cepa e a amostra foi utilizada como branco para avaliação na fração ao longo do experimento. Já para o B2 também se seguiu o mesmo padrão, mas sem adição da fração de saturados e a amostra foi utilizada como branco na avaliação do crescimento bacteriano.

Todos os frascos foram submetidos ao *Shaker* (Lab Companion™) nas condições de 180 rpm e 40 °C de temperatura e as coletas foram realizadas no primeiro dia, em seguida nos dias 6, 12 e 18.

4.4.6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO E QUANTIFICAÇÃO GENÉTICA

O estudo do crescimento foi conduzido a partir da retirada de uma alíquota contendo 200 µl do experimento em placa multipos e analisado por espectrofotômetro, modelo LMR 96-4 (*Loccus*) em microplaca a absorvância de 590 nm.

Para análise genética inicialmente foi feito o processo de extração de DNA utilizando o kit de extração da Norgen Biotek Corp. TM, seguindo todas as etapas descritas no protocolo do fabricante. Para determinar a concentração e a pureza do DNA extraído foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop TM ND-2000 UV-Vis (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

Em seguida, utilizando o primer para 16S rRNA (Tablea 1) foi gerada a curva padrão. O gene foi amplificado por PCR convencional e a limpeza do produto da PCR foi realizada com a utilização de PEG 20%.

O número de cópias dos genes *16S rRNA* em cada amostra foi quantificado pelo método de PCR quantitativo (qPCR). O processo qPCR foi realizado usando AriaMx Real-Time PCR (qPCR) AgilentTM e um protocolo de fluoróforo SYBR Green I. Os volumes de reação de 20 µl continha 10µl de GoTaq® Qpcr Master Mix, 0,35 µl de cada primer (10µM) (Tabela 1), 1 µl de DNA modelo e 8,3 µl de água grau de PCR. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata. A adição de 2 µl de água de grau PCR em vez de molde de DNA foram usada como controle negativo.

A ciclagem térmica consistiu em 95 °C por 5 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, anelamento a 55 °C por 30 s e alongamento a 72 °C por 35 s. Após a amplificação, uma curva de fusão foi obtida aquecendo os produtos a 95 °C, resfriando-os a 65 °C e, em seguida, aquecendo-os gradualmente até 95 °C por 30 s em seguida a 55 °C por 30 s a uma taxa de 0,2 °C/s e por fim 95 °C por 30s. Foi calculada a média dos resultados triplicados das medições de PCR em tempo real. O número dos genes em uma alíquota foi calculado usando a massa (m) dos fragmentos em um determinado volume e o peso molecular (Wm) usando a seguinte equação:

$$\text{Cópias } \mu\text{l}^{-1} = (m \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23})/Wm$$

A concentração das cópias dos genes foram calculadas no Software AriaMx Real-Time PCR System V.1.7 (AgilentTM).

Tabela 1 - Primer 16S rRNA utilizado para quantificação absoluta por qPCR

| Gene | Primer | Sequência | Fragmento | Temperatura de anelamento °C | Referências |
|-----------------|--------|----------------------|-----------|------------------------------|----------------------|
| 16S rRNA | 515F | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA | 411 | 55 | Caproso, et al. 2011 |
| | 926R | CCGYCAATTYMTTTRAGTTT | | | Parada, et al. 2016 |

Fonte: Autoria Própria.

4.4.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE ALCANOS

A extração dos saturados ao longo do experimento foi realizada misturando vigorosamente o conteúdo com 30 mL dividido em 3 etapas com adição 10 mL de DCM em um funil de separação, permitindo que a mistura se separasse em diferentes frações. A fração DCM com os alcanos foi coletada cuidadosamente em balão de fundo redondo passando por um funil contendo sílica gel e algodão. Os três balões de cada amostra foram rotaevaporados e o analito transferido, utilizando DCM, para um *vial* por amostra. Posteriormente as amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/FID, *modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA*).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

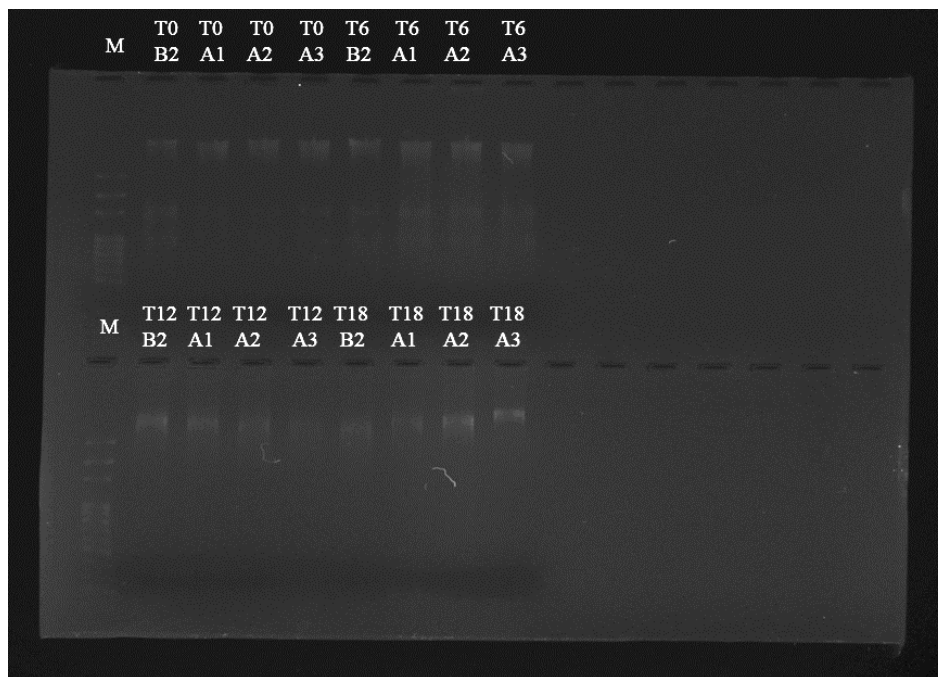
4.5.1 ISOLAMENTO E PUREZA DO DNA

Para o isolamento do DNA foi utilizado o *pellet*, após a centrifugação do conteúdo de cada amostra, que foi submetido ao protocolo do kit comercial Norgen™. Para avaliação quantitativa e qualitativa do material extraído procedemos com a utilização do método espectrofotométrico no equipamento NanoDrop™, bem como análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 3). Os valores obtidos estão descritos abaixo (Tabela 2). Na tabela é possível observar os tempos T0 e T6 correspondem a elevadas quantidades de DNA em contra partida os tempos T12 e

T18 representam uma queda desses valores aplicando uma abordagem temporal desse parâmetro.

A relação apresentada entre a razão das absorvâncias 260/280 mensuram um cálculo indicativo da pureza das amostras. Onde a máxima absorvância para o DNA corresponde ao comprimento de onda de 260 nm, enquanto as proteínas vão apresentar absorvância a um raio UV no comprimento de onde de 280 nm. O valor mínimo para uma amostra ser considerada pura é de 1,8 como resultado da relação das absorvâncias obtidas (KE et al, 2018; SHE et al, 2019; OKORO et al. 2022).

Figura 3 - Gel de eletroforese das amostras de DNA extraído



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Valores da quantificação obtida em espectrofotômetro NanoDrop™

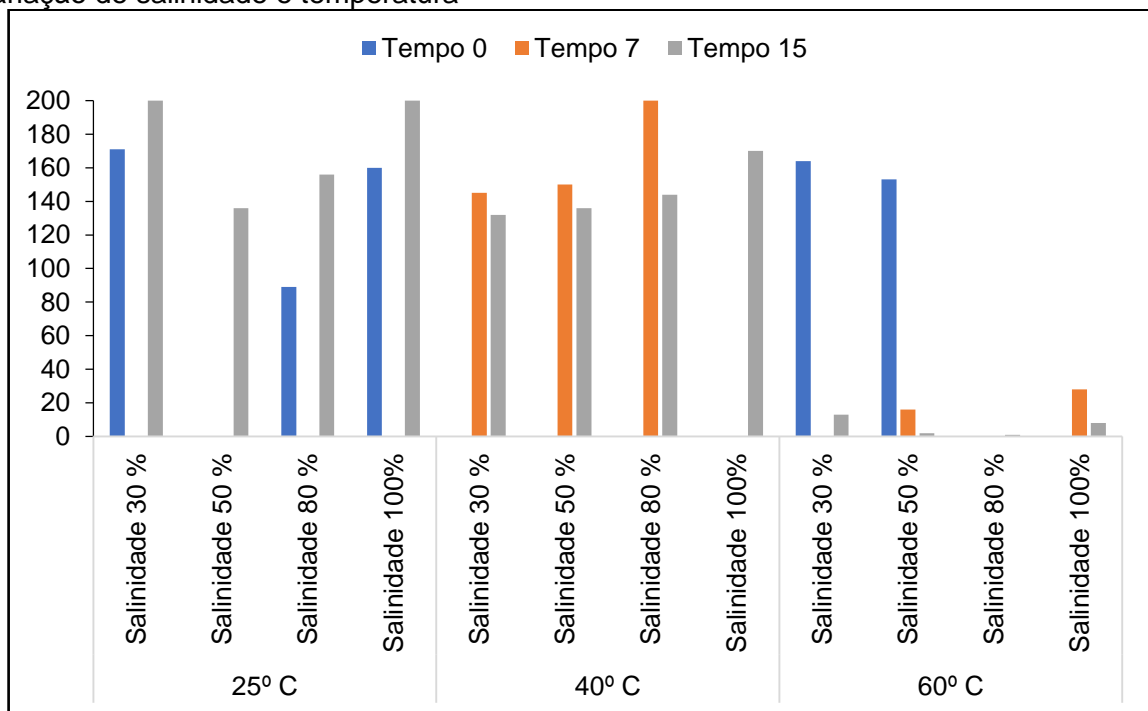
| | | Quantificação de DNA (NanoDrop™) | | |
|------------|--------|----------------------------------|----------|----------|
| | | ng/μl | A260/280 | A260/230 |
| T0 | Branco | 289,3 | 2,09 | 2,17 |
| | A1 | 311,6 | 2,06 | 2,07 |
| | A2 | 280 | 2,05 | 2,12 |
| | A3 | 377,5 | 2,07 | 2,21 |
| T6 | Branco | 298,9 | 2,05 | 2,14 |
| | A1 | 344,2 | 2,08 | 2,17 |
| | A2 | 200,3 | 2,07 | 2,14 |
| | A3 | 403,7 | 2,08 | 2,16 |
| T12 | Branco | 73,6 | 2,01 | 1,93 |
| | A1 | 30 | 1,99 | 1,7 |
| | A2 | 42,1 | 1,97 | 1,87 |
| | A3 | 31 | 1,94 | 1,82 |
| T18 | Branco | 98,8 | 1,98 | 2,02 |
| | A1 | 153,7 | 1,98 | 2,05 |
| | A2 | 27,5 | 1,87 | 1,85 |
| | A3 | 27,7 | 1,8 | 1,37 |

Fonte: Autoria Própria.

4.5.2 EFEITO DA SALINIDADE E TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DA CEPA

Os resultados obtidos nos tempos 7 e 15 (Figura 4) foram favoráveis a temperatura de 40 °C combinado com a salinidade de 80% com o crescimento em placa superior a 200 UFCs no tempo 7 e 144 UFCs no tempo 15. No geral, foi possível avaliar que o crescimento da *Pseudomonas* sp. obteve maior influência da temperatura do que da salinidade.

Figura 4 - Resultado do ensaio de crescimento bacteriano. Os dados representam os valores de UFC/mL para crescimento nos experimentos nos tempos 0, 15 e 7 dias com variação de salinidade e temperatura



Fonte: Autoria Própria.

Em teste para avaliar os efeitos da temperatura sobre o crescimento bacteriano KE et al, 2018 utilizou microrganismos de diversas linhagens, dentre as quais incluía o gênero *Pseudomonas*, seus resultados apontaram que nas temperaturas testadas (20, 30, 40, 50 e 60 °C) a temperatura de 40 °C apresentou o maior valor para O. D. (Densidade Óptica) que foi o seu método de avaliação. O teste foi aplicado com objetivo de avaliar a resistência da cepa, tendo em vista que os estudos são preliminares para sugerir aplicação das bactérias em ambiente de

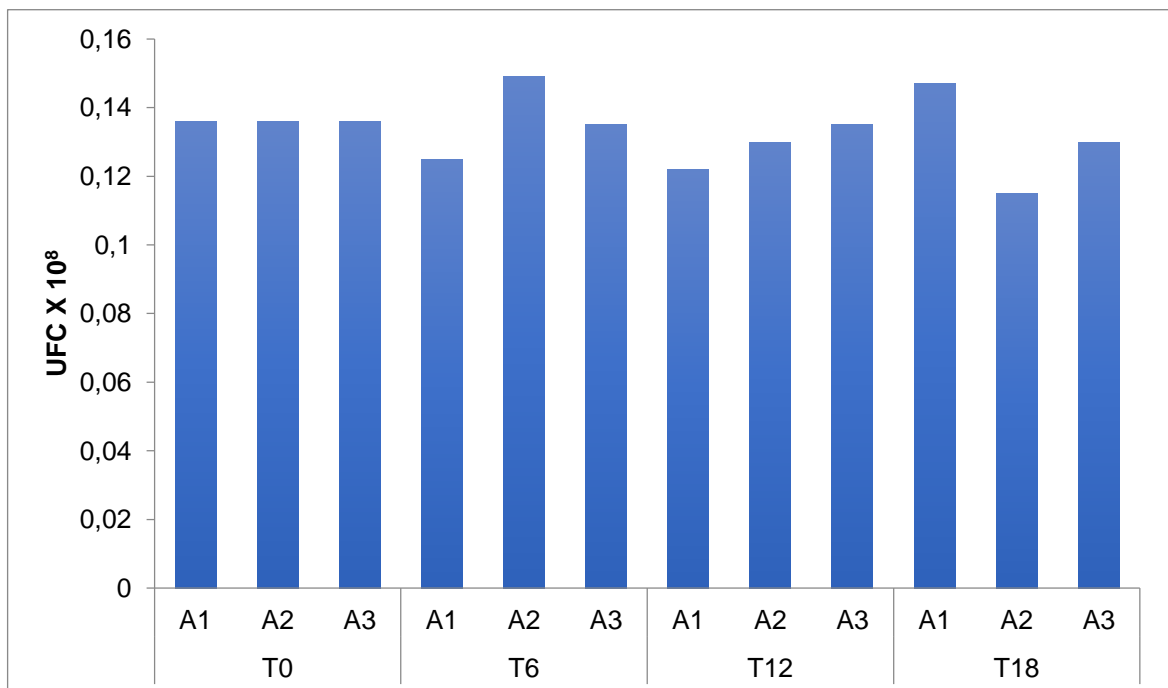
reservatório de petróleo, cujas condições são consideradas extremas em diversos parâmetros incluindo a temperatura e a salinidade.

4.5.3 CARACTERÍSTICAS DO CRESCIMENTO BACTERIANO

A análise do crescimento bacteriano foi realizada através da leitura das amostras em espectrofotômetro, modelo LMR 96-4 (*Loccus*) em microplaca a absorvância deu utilizando um comprimento de onda de 590 nm para obter o grau de absorvância das amostras. O que se observou ao longo do experimento é que o número de células teve uma baixa variação entre o período inicial e final (Figura 5), levando a inferir que não houve crescimento celular significativo nos tratamentos.

Através da ferramenta analítica foi possível obter uma análise rápida no monitoramento do crescimento bacteriano, gerando dados de alta confiabilidade devido o método ser considerado clássico, principalmente, quando se trata de avaliar o crescimento de culturas puras (BROWN, 2022).

Figura 5 - Disposição dos números de UFC de cada amostra durante o experimento



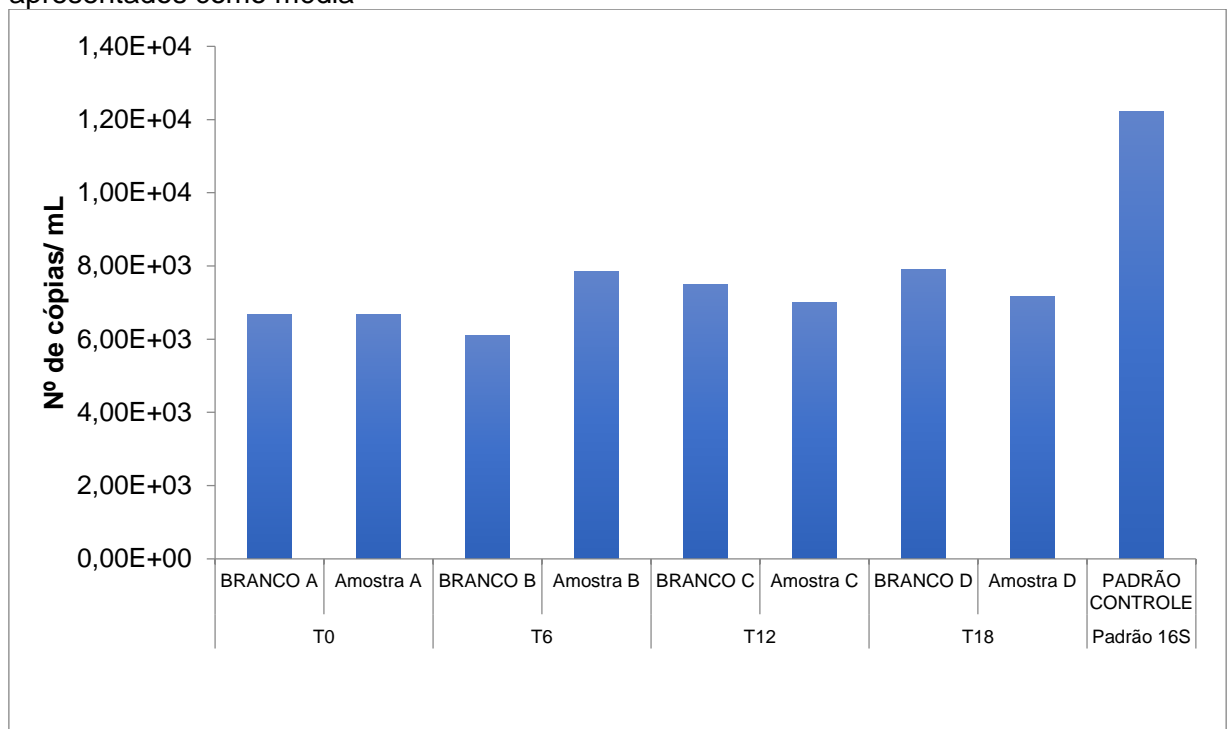
Fonte: Autoria Própria.

4.5.4 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE 16S RRNA POR QPCR

A qPCR quantitativo foi realizada para estimar a população total de *Pseudomonas* sp. para cada tratamento ao longo do experimento. Como curva padrão foi utilizada o produto da PCR tratado por PEG nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . No gráfico da Figura 6 é possível verificar que ao longo do tempo a quantificação não aumenta, sendo uma provável inferência para indicar que não houve aumento da população bacteriana. Esse dado corrobora com o que foi observado através da quantificação bacteriana por O.D.

É possível também destacar que as médias dos tratamentos que contém a cepa só apresentam um leve aumento no T6 nos gráficos da Figuras 6 apresentando um número de cópias de $7,86 \times 10^3$, apresentando no mesmo ponto uma relação equiparada de aumento com a análise por O.D. sendo um ponto considerado positivo de resposta de crescimento no segundo ponto de análise.

Figura 6 - Número de cópias do gene *16S rRNA* de *Pseudomonas* sp. Os resultados estão apresentados como média



Fonte: Autoria Própria.

A ferramenta de análise mostra sua eficiência e entra como método alternativo para avaliação do quantitativo de linhagens bactérias. A técnica tem sido muito

utilizada para mensurar o quantitativo de linhagens bacterianas através da marcação da informação genética, sendo capaz de detectar genes individuais das bactérias até em baixas concentrações e sua aplicação é possível desde um objetivo geral até um mais específico com base nos *primers* utilizados (COTTO, 2015; BROWN, 2022).

4.5.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DOS ALCANOS

Para esta etapa foram elaborados gráficos comparativos entre o branco e a média da triplica de cada tratamento e entre o início e fim do experimento (Figura 7). Para todos os tempos o que se observa é uma perda dos compostos mais leves entre C8 a C16.

Em comparação com o branco, cuja amostra não continha bactéria, mas a solução utilizada foi a mesma para todos os tratamentos, ou seja, continha biossurfactante do processo inicial de bioestimulação. A presença desse composto, bem como a possível presença de bioemulsificantes pode justificar a perda dos compostos mais leves ao final do experimento. De maneira geral esses compostos bioativos são produzidos por diversos microrganismos aplicados no processo de recuperação avançada de óleo (CHAFALE, 2022).

A atividade que se observa na presença mais acentuada desses compostos emulsificantes é a alteração das propriedades do fluido para solubilizar a mistura entre óleo e água levando a formação de emulsões que vão deter o óleo em seu núcleo micelar (CHAFALE, 2022).

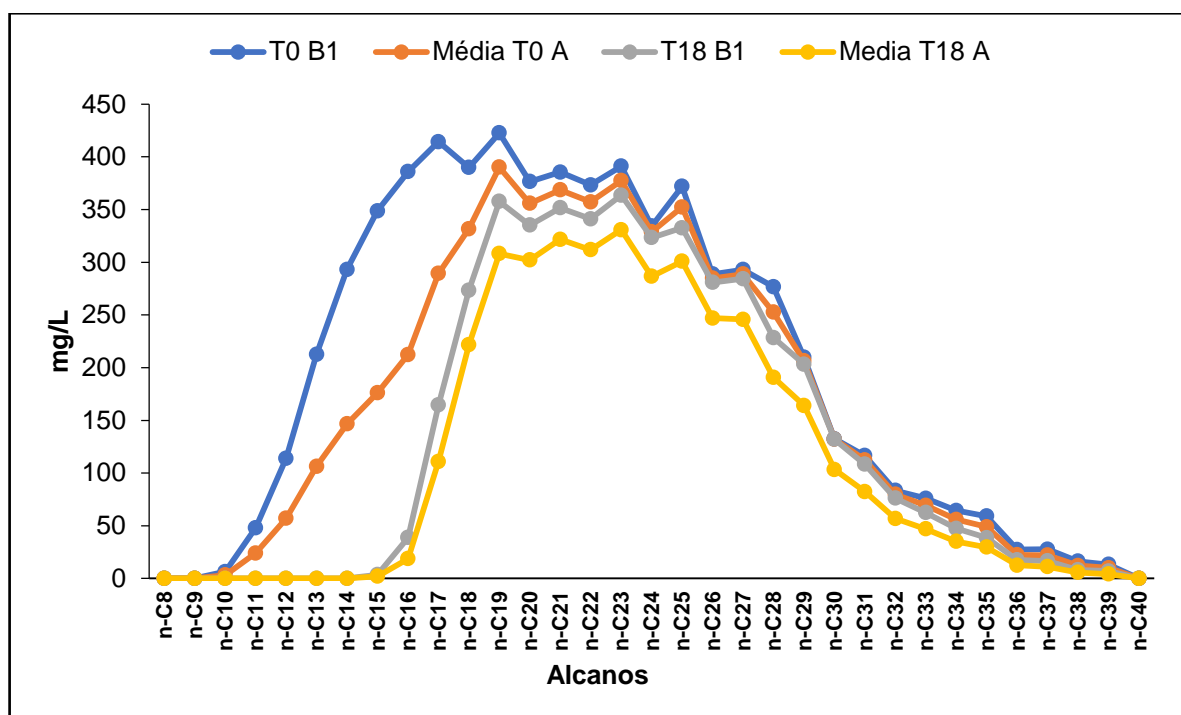
Com o aprisionamento de algumas gotículas de óleo, essa ponte entre compostos orgânicos, água e óleo em que a micela se forma minimiza a energia livre, levando a um aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos no meio hidrofóbico favorecendo a manutenção do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (ASTUTI et al., 2019).

Um fator que também está associado à biodisponibilidade dos hidrocarbonetos nesse tipo de tratamento é a salinidade. Um estudo realizado por Khademolhosseini et al. (2019) aponta que a presença de íons de sal atraem as moléculas de água fazendo com que o biossurfactante se apresente na interface. Uma elevada quantidade de sal no meio pode diminuir a atividade emulsificante, pois a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos apresenta uma tolerância entre 10-

15% de salinidade no meio para ser acessado pelos biossurfactantes (HENTATI et al, 2021).

Quando comparado os brancos do tempo inicial e final com a média inicial e final das amostras (Figura 8) é possível identificar que as amostras sem microrganismo mantêm um quantitativo geral de alcanos mais alto do que os tratamentos, isso sugere que há uma possível ação de degradação pelas bactérias presentes no meio.

Figura 8 - Comparação do quantitativo de alcanos em entre as amostras e o branco



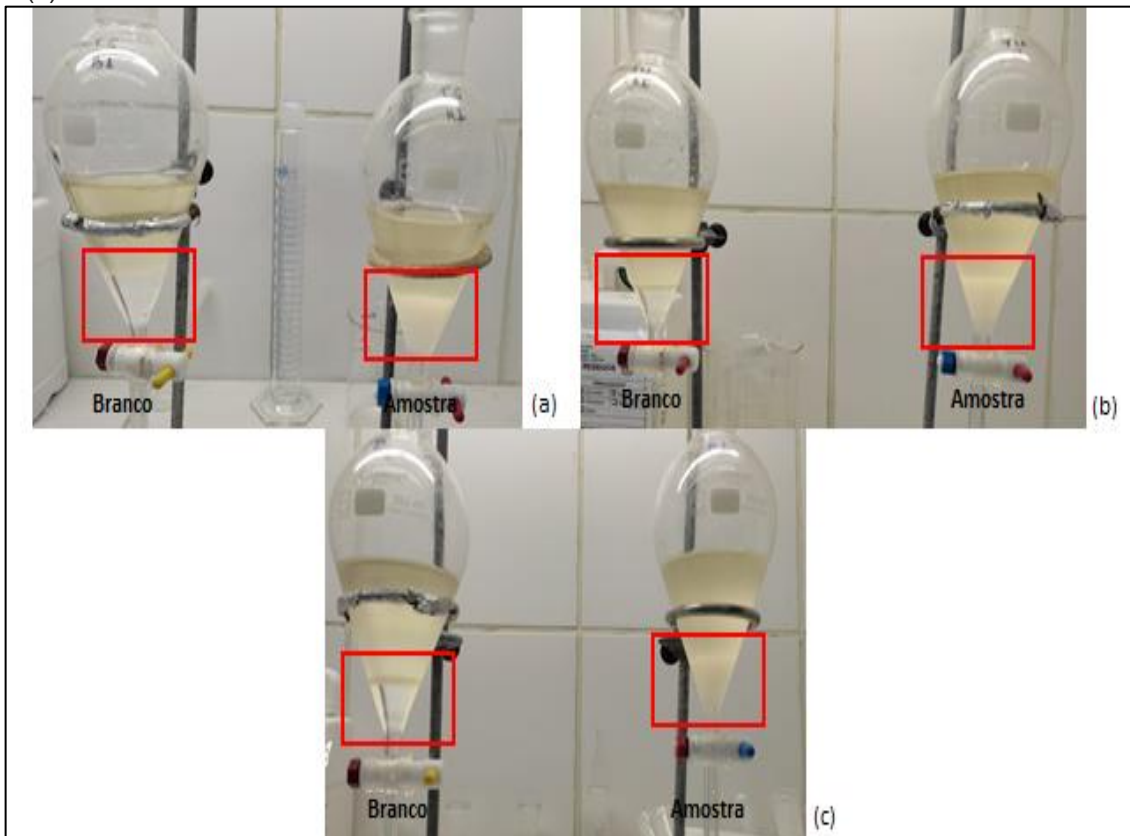
Fonte: Autoria Própria.

Através da figura 9 é possível demonstrar onde a ação dos microrganismos foi maior. A taxa de degradação dos compostos infere que as cadeias mais pesadas a partir de C31 até C39 há alta atividade de degradação, entretanto os compostos intermediários entre C19 e C30 tiveram o menor percentual de degradação. Esse comportamento evidenciado nos resultados é esperado para aplicação da bactéria *Pseudomonas*, pois esse microrganismo apresenta uma alta capacidade de metabolizar cadeias mais longas de hidrocarbonetos a exemplo da *Pseudomonas aeruginosa* com degradação reportada em cadeias entre C36-C40 e *Pseudomonas fluorescens* degrada entre C12 e C32 (NIU et al. 2020; CHAFALE, et al 2022).

O fator de recuperação obtido após o final do tratamento pode ser observado na Figura 10. Onde os valores são correspondentes às médias das triplicatas, então a gente observa a maior recuperação das frações intermediárias entre C18 a C30 não houve recuperação significativa entre C8 e C14. Que é possível estar relacionado à formação das micelas pelo biossurfactante.

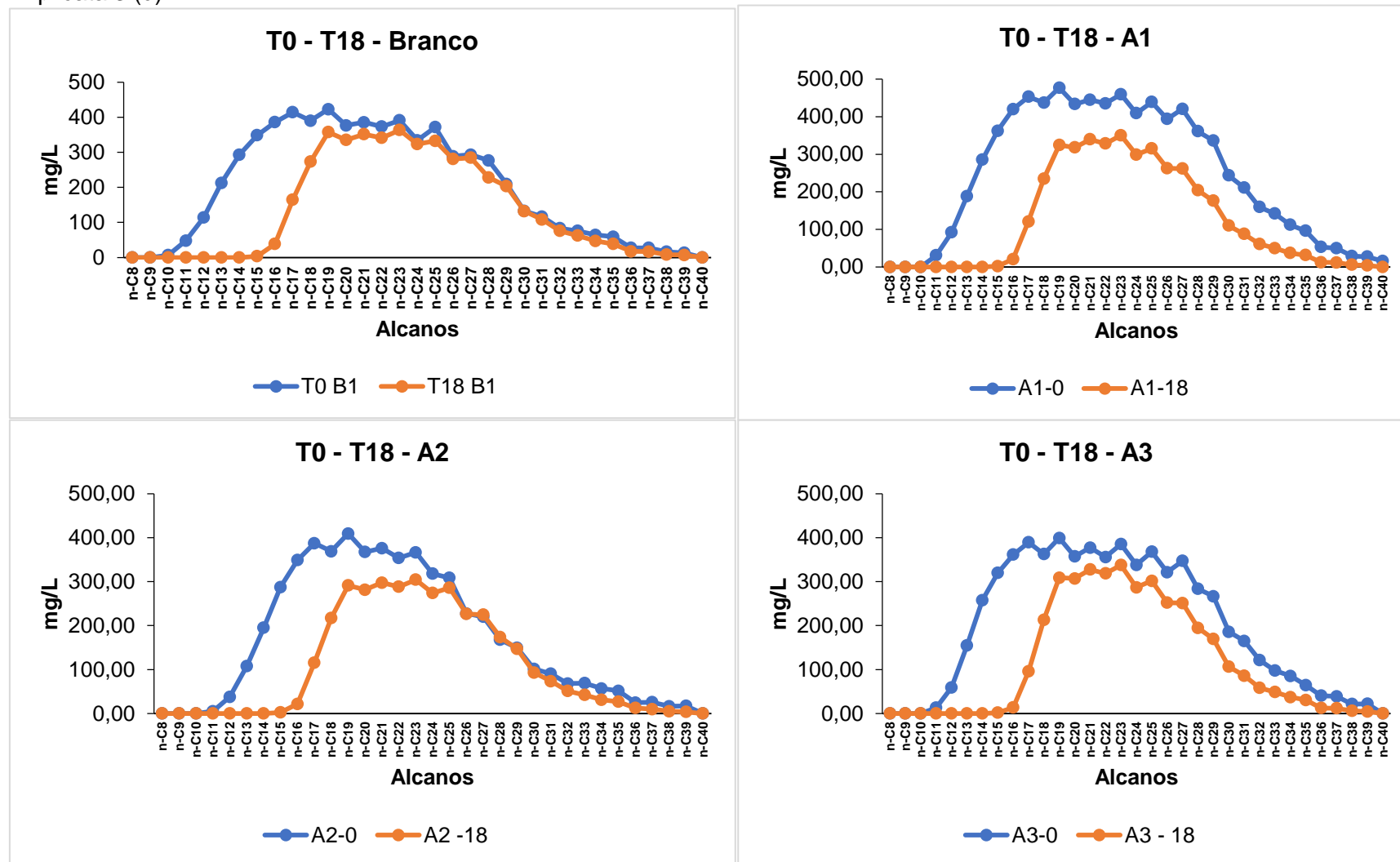
É possível observar que a recuperação nas amostras branco, ausentes de bactéria, mas com presença de biossurfactante, as taxas de recuperação são mais elevadas em comparação com os tratamentos. Durante o processo experimental na coleta de amostras foi possível constatar que visivelmente as amostras controle apresentavam baixa formação de emulsão, que formam estruturas para estabilizar a reação entre a água e óleo, durante o processo de agitação para extração líquido-líquido, realizada para obter a fração de saturados a ser analisada (Figura 11). Isso nos indica uma possível explicação para as taxas mais elevadas de recuperação nas amostras branco.

Figura 11 - Registros fotográficos evidenciando a formação de emulsão no processo de extração, destacando a diferença entre o branco e o tratamento nos dias: T6 (a), T12 (b) e T18 (c)



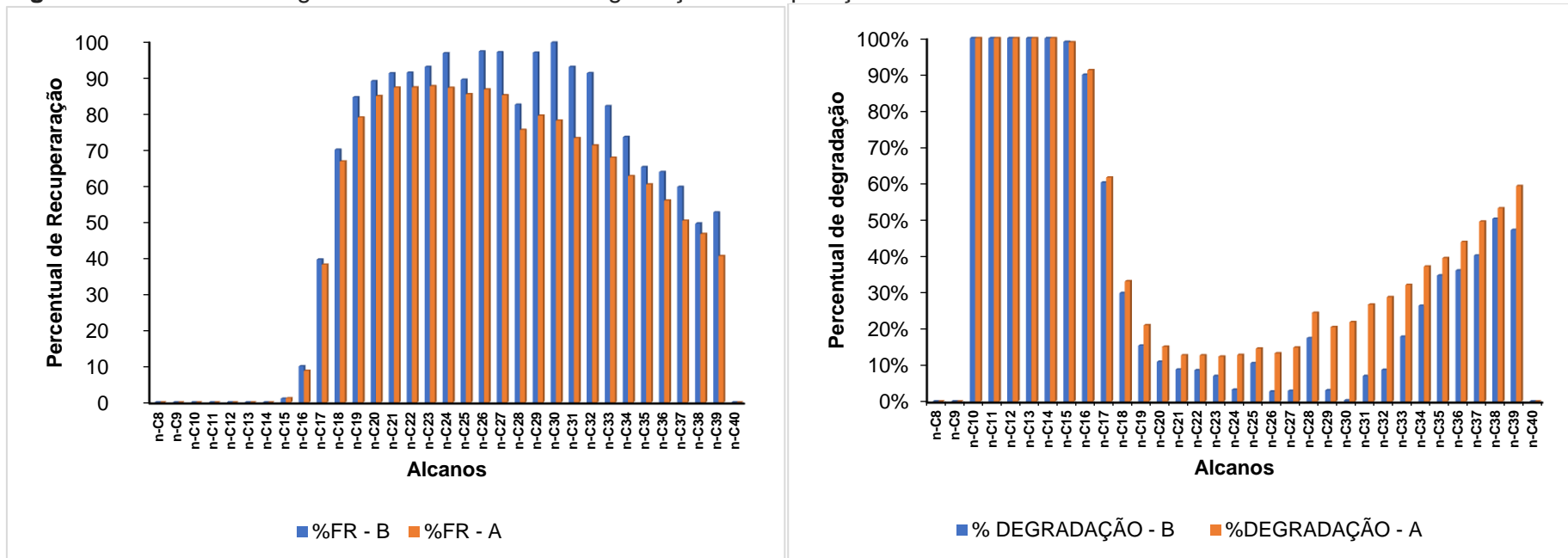
Fonte: Autoria Própria.

Figura 7 - Quantificação dos alcanos entre o tempo inicial e final do experimento nas amostras. Branco (a), Triplicata 1 (b), Triplicata 2 (c) Triplicata 3 (d)



Fonte: Autoria Própria

Figura 9 - Demonstrativo gráfico entre as taxas de degradação e recuperação de alcanos



Fonte: Autoria Própria.

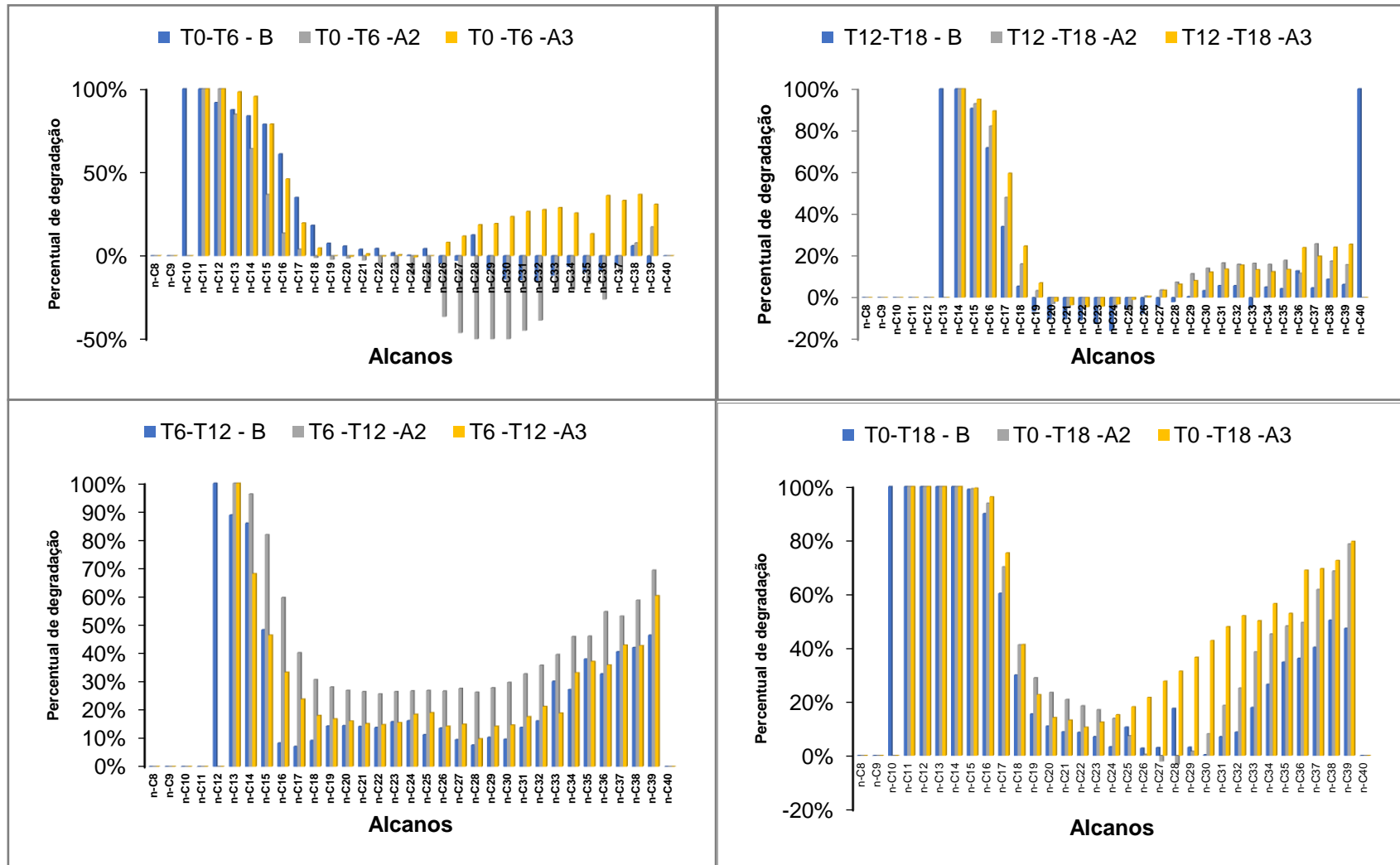
Em relação ao que pode ser observado T0 – T6 (Figura 12), o tratamento A1, foi desconsiderado, pois apresentou em um comportamento diferente, que pode ter sido causado por erro analítico. O tratamento A2 apresenta um indicativo para um processo de formação de compostos intermediários (C23 - C32), pois essas taxas são negativas em relação ao processo de degradação, apresentando o valor mais expressivo no C30 com - 54%. Para a amostra A3 o gráfico demonstra baixos valores nos compostos intermediários em relação a negativa de degradação, entretanto esses valores em sua maioria também não indicam degradação.

Para o T6 – T12 os resultados se mostraram positivo para degradação em todos os tratamentos, ou seja, houve uma grande perda dos compostos nessa fase, relacionando com a população bacteriana, foi observada uma redução do seu número nas análises feitas. O que acontece em relação aos tempos T12 e T18 é uma retomada do que aconteceu na primeira análise com as cadeias entre C19 – C26 apresentação valores negativos em relação a taxa de degradação, enquanto as taxas das cadeias mais pesadas crescem em degradação, enquanto o que se observa nesse período para a quantificação bacteriana é uma estabilidade na população. Para análise geral do tempo de experimento T0 – T18 a degradação se mostra positiva. Esse indicativo é um importante parâmetro que serve de base para estabelecer o tempo adequado onde a bactéria atua de maneira biotransformadora sem consumir os hidrocarbonetos no processo de degradação.

Então, o tempo 6 possui o comportamento mais esperado para aplicação da tecnologia de recuperação microbiana avançada de óleo. Se apresentando com indicativos positivos que estão relacionados ao que é possível se recuperar associando bactéria e biossurfactante e o tempo curto favorecendo uma resposta rápida.

Uma importante associação para melhora do desempenho na recuperação frente ao processo de emulsificação é a técnica de demulsificação, que pode ter origem química ou biológica. A demulsificação tem sua aplicabilidade a partir da agregação de óleo que ocorre nas micelas e é uma etapa sequencial na qual o demulsificante rompe a agregação de gotículas seguido de coalescência para recuperação final do óleo (MOHEBALI et al., 2012; CHEFALI et al., 2022).

Figura 12 - Avaliação da degradação das amostras A2 e A3 entre os tempos T0 e T6



Fonte: Autoria Própria.

4.6 CONCLUSÕES

A avaliação preliminar do uso da *Pseudomonas* sp. em fração parafínica do petróleo demonstrou potencial de aplicação no processo de biotransformação dos referidos compostos. Com os resultados de cromatografia gasosa foi possível observar o comportamento dos hidrocarbonetos de cadeia simples, ao longo do experimento e constatar a ação microbiana sobre a fração. Nesta etapa também foi importante observar a formação de emulsão na extração dos compostos, devido a produção de surfactante biológico atuando como coadjuvante da biotransformação, sendo um ponto positivo para o objetivo proposto.

Para o monitoramento do crescimento bacteriano foram aplicadas duas metodologias (O.D e qPCR), nas quais estas se mostraram eficientes e apresentaram valores similares. Com isso, conseguimos inferir que não houve crescimento ao longo do experimento geral, havendo um leve crescimento até o tempo 6, indicando a necessidade de bioestimular e/ou bioaumentar o meio a partir do sexto dia. Levando em consideração o dinamismo do processo de produção/refino do petróleo, ter uma cepa que atua na biotransformação de compostos parafínicos em tempo curtos, se torna um ponto positivo para pesquisa, sendo necessário um estudo mais aprofundado entre os tempos 0 e 6.

Contudo para melhor previsão do processo de MEOR utilizando a cepa *Pseudomonas* sp, vários parâmetros ainda precisam ser explorados e melhor interpretados, a exemplo do biosurfactante produzido e sua ação nas parafinas, bem como, a avaliação da necessidade de uma etapa de demulsificação da amostra e medição da viscosidade e da tensão interfacial da fração de saturados, além do estudo da biotransformação de outros compostos parafínicos, a exemplo dos cicloalcanos, presentes na fração saturada do petróleo.

4.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Shell Brasil por meio do projeto "Pesquisa em Geomicrobiologia: Biotecnologia Microbiana Aplicada à Biodegradação e Recuperação do Petróleo do Instituto de Geociências da Universidade Federal da

Bahia (UFBA) – GEOQPETROL – GEOMICRO” – ANP 20720-9 e a importância estratégica do apoio da ANP por meio do regulamento de arrecadação de P&D. Ao LEPETRO – Excelência em Geoquímica de Petróleo, Energia e Meio Ambiente. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil [Código Financeiro 001].

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através do presente estudo demonstram indicativos satisfatórios para o potencial de *Pseudomonas* sp. aplicada a recuperação de petróleo. Por ser um estudo pioneiro para a cepa utilizada o trabalho conduz a novas perspectivas de investigação a partir do que já foi comprovado. O aprimoramento desse trabalho se dará com a avaliação de genes específicos que possam ter atuado no processo de biotransformação indicado nos resultados. A proposta terá continuidade como projeto de doutorado com a ampliação de parâmetros com o objetivo de simular as condições *in situ*, bem como será expandida a avaliação para outros microrganismos quanto ao seu potencial biotransformador de petróleo.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, C. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. R. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 291-294, 2004.
- ALOMAIR, O. A.; MATAR, K. M.; ALSAEED, Y. H. Nanofluids application for heavy oil recovery. In: **SPE Asia Pacific oil & gas conference and exhibition**. Society of Petroleum Engineers, 2014.
- ALVARADO, V.; MANRIQUE, E. Enhanced oil recovery: an update review. **Energies**, v. 3, n. 9, p. 1529-1575, 2010.
- ALVES, J. K. P.; MENDES, P.R. S. **Estudo sobre a influência da contração do petróleo ao gelificar no reinício do escoamento**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.
- AL-YAARI, Mohammed. Paraffin wax deposition: Mitigation and removal techniques. In: **SPE Saudi Arabia section Young Professionals Technical Symposium**. Society of Petroleum Engineers, 2011.
- ASTUTI, Dea Indriani et al. Screening and characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. G3 and its applicability for enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 9, n. 3, p. 2279-2289, 2019.
- BECKMAN, J. W. Action of bacteria on mineral oil. **Ind. Eng. Chem., News Ed.**, v. 4, n. 21, p. 3, 1926.
- BROWN, Damon C.; TURNER, Raymond J. Assessing Microbial Monitoring Methods for Challenging Environmental Strains and Cultures. **Microbiology Research**, v. 13, n. 2, p. 235-257, 2022.
- CÂMARA, J. M. D. A.; SOUSA, M. A. S. B.; BARROS NETO, E. L.; OLIVEIRA, M. C. A. Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR). **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 9, n. 3, p. 2333-2341, 2019.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. supplement_1, p. 4516-4522, 2011.
- CHAFALE, Ayushi; KAPLEY, Atya. Biosurfactants as microbial bioactive compounds in microbial enhanced oil recovery. **Journal of Biotechnology**, 2022.
- COTTO, Ada et al. Quantitative polymerase chain reaction for microbial growth kinetics of mixed culture system. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1928-1935, 2015.

DUTTA, T. K.; HARAYAMA, S. Time-of-flight mass spectrometric analysis of high-molecular-weight alkanes in crude oil by silver nitrate chemical ionization after laser desorption. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 5, p. 864-869, 2001.

GAO, H.; ZHANG, J.; LAI, H.; XUE, Q. Degradation of asphaltenes by two *Pseudomonas aeruginosa* strains and their effects on physicochemical properties of crude oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 122, p. 12-22, 2017.

GBADAMOSI, Afeez O.; JUNIN, R. An overview of chemical enhanced oil recovery: recent advances and prospects. **International Nano Letters**, v. 9, n. 3, p. 171-202, 2019.

GOODMAN, S. H. **Investigation into the Potential Application of Microbial Enhanced Oil Recovery on Unconventional Oil: A Field Specific Approach**. 2017. 294 f. Tese de Doutorado. University of Liverpool, Liverpool, 2017.

HALIM, A. Y. **Application of microorganisms for enhanced oil recovery**. 2015. 233 f. Tese de Doutorado (Center for Energy Resources Engineering), Technical University of Denmark, Dinamarca. 2015.

HENTATI, Dorra et al. Investigation of halotolerant marine *Staphylococcus* sp. CO100, as a promising hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacterium, under saline conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 277, p. 111480, 2021.

KARAN, K.; RATULOWSKI, J.; GERMAN, P. Measurement of waxy crude properties using novel laboratory techniques. In: **SPE annual technical conference and exhibition**. Society of Petroleum Engineers, 2000.

KARIMI, M., MAHMOODI, M., NIAZI, A., AL-WAHAIBI, Y., & AYATOLLAHI, S. Investigating wettability alteration during MEOR process, a micro/macro scale analysis. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, v.95, p. 129-136, 2012.

KE, Cong-Yu et al. A pilot study on large-scale microbial enhanced oil recovery (MEOR) in Baolige Oilfield. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 247-253, 2018.

KHADEMOLHOSSEINI, Rasoul et al. Investigation of synergistic effects between silica nanoparticles, biosurfactant and salinity in simultaneous flooding for enhanced oil recovery. **RSC advances**, v. 9, n. 35, p. 20281-20294, 2019.

MOHEBALI, Ghasemali; KAYTASH, Ashk; ETEMADI, Narges. Efficient breaking of water/oil emulsions by a newly isolated de-emulsifying bacterium, *Ochrobactrum anthropi* strain RIPI5-1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 120-128, 2012.

MUSSE, A. P. S.; QUINTELLA, C. M. Recuperação avançada de petróleo. **Caderno de prospecção**. v. 2, n. 1, p. 12-22, 2009.

MUZZAFARUDDIN, K. Enhanced Oil Recovery. **International Journal of Petroleum and Petrochemical Engineering**. v. 5, n. 4, p. 10-13, 2019.

NAZINA, T. N.; GRIGOR'YAN, A. A.; SHESTAKOVA, N. M.; BABICH, T. L.; IVOILOV, V. S.; FENG, Q.; NI, F.; WANG, J.; SHE, Y.; XIANG, T. LUO, Z.; BELYAEV, S. S.; IVANOV, M. V. Microbiological investigations of high-temperature horizons of the Kongdian petroleum reservoir in connection with field trial of a biotechnology for enhancement of oil recovery. **Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 287-296, 2007.

NIU, J.; LIU, Q.; LV, J.; PENG, B. Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. p. 107350, 2020.

OKORO, Emmanuel E.; EFAJEMUE, E. A.; SANNI, S. E.; OLABODE, O. A.; ORODU, O. D.; OJO, T. Application of thermotolerant petroleum microbes at reservoir conditions for enhanced oil recovery. **Petroleum**, 2022.

PARADA, ALMA E.; NEEDHAM, DAVID M.; FUHRMAN, JED A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.

PATEL, J.; BORGOHAIN, S.; KUMAR, M.; RANGARAJAN, V.; SOMASUNDARAN, P.; SEN, R. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1539-1558, 2015.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History**. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2005. 492 p.

PHAN, T.; FAUST, M.; BALSAMO, V.; CHAMPION, N. More Effective Solution to Treat Paraffinic Crude Oil Wells. In: **SPE International Conference on Oilfield Chemistry**. Society of Petroleum Engineers, 2019.

RICOMARTÍNEZ, R., SNELL, T.W., SHEARER, T.L. Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A® to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). **Environ. Pollut.** v. 173, n.173, p. 5-10, 2013.

SATTER, A.; IQBAL, G. M. Enhanced oil recovery processes: thermal, chemical, and miscible floods. **Reservoir Engineering: The Fundamentals, Simulation, and Management of Conventional and Unconventional Recoveries**, p. 313-337, 2016.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, Mukesh; SANGWAI, Jitendra S. Enhanced microbial degradation of waxy crude oil: a review on current status and future perspective. **International Journal of Oil, Gas and Coal Technology**, v. 16, n. 2, p. 130-165, 2017

SHE, H.; KONG, D.; LI, Y.; HU, Z.; GUO, H. Recent advance of microbial enhanced oil recovery (MEOR) in China. **Geofluids**, v. 2019, 2019.

SHIBULAL, B.; AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J. Microbial enhanced heavy oil recovery by the aid of

inhabitant spore-forming bacteria: an insight review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SHIBULAL, B. et al. Microbial-enhanced heavy oil recovery under laboratory conditions by *Bacillus firmus* BG4 and *Bacillus halodurans* BG5 isolated from heavy oil fields. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 1, p. 1, 2018.

TATAR, A. Microbial Enhanced Oil Recovery: Microbiology and Fundamentals. *In*: BAHADORI, A. **Fundamentals of Enhanced Oil and Gas Recovery from Conventional and Unconventional Reservoirs**. Austrália: Gulf Professional Publishing. p. 291-508. 2018.

TIAN, L., BAI, Y.L., ZHONG, J.J. Recent developments in the degradation of toxic organic pollution by microorganisms. **J. Ind. Microbiol.** V. 3, n. 2, p. 46-50, 2000.

TISSOT, Bernard P.; WELTE, Dietrich H. **Petroleum formation and occurrence**. 2 ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 1984. 702 p.

YERNAZAROVA, A.; KAYIRMANOVA. G.; BAUBEKOVA, A.; ZHUBANOVA, A. Microbial Enhanced Oil Recovery. *In*: ROMERO-ZERON, L. (Ed.). **Chemical Enhanced Oil Recovery (cEOR) - a Practical Overview**, InTech, 2016. p. 2006.

YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S.; MCINERNEY, M. J. *In*: Advances in Applied Microbiology. **Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities**, v. 66, p. 141-251, 2009.