

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0815249-7 A2**

(22) Data de Depósito: 22/08/2008
(43) Data da Publicação: 05/03/2013
(RPI 2200)



(51) *Int.Cl.:*

C12Q 1/68
C02F 3/34
C12P 7/64
C09K 8/60
E21B 43/16

(54) **Título:** MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO A PARTIR DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO

(30) **Prioridade Unionista:** 24/08/2007 US 60/957,776

(73) **Titular(es):** E.I. DU PONT DE MOURS AND COMPANY

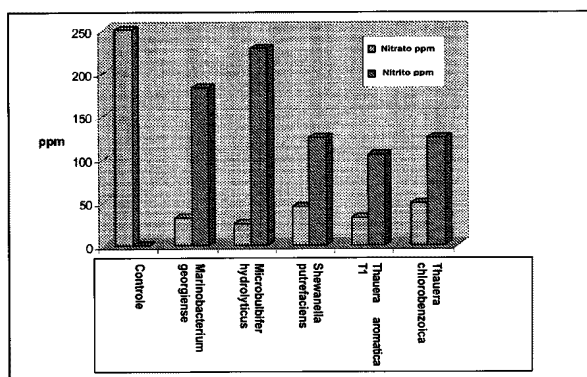
(72) **Inventor(es):** LINDA L. HNATOW, ROBERT D. FALLON, SCOTT CHRISTOPHER JACKSON, SHARON JO KEELER

(74) **Procurador(es):** Cristiane Araújo Rodrigues

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2008073954 de 22/08/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2009/029502de 05/03/2009

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO A PARTIR DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO. A presente invenção descreve um método de identificação filogenético novo para a identificação de espécies de bactérias desnitrificantes anaeróbias nativas em um poço de petróleo que são capazes de modificar as propriedades do petróleo bruto para aumentar sua recuperação.



“MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO A PARTIR DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao campo da microbiologia ambiental e a modificação das propriedades do petróleo bruto pesado utilizando micro-organismos. Mais especificamente, os micro-organismos desnitrificantes anaeróbios puros são identificados e aplicados para modificar as propriedades do petróleo bruto pesado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O desafio para atender a demanda crescente por petróleo inclui o aumento da recuperação do petróleo bruto a partir de reservatórios de petróleo pesado. Este desafio resultou na expansão de esforços para desenvolver processos de recuperação de petróleo alternativos custo-eficiente (Kianipey, S. A. e Donaldson, E. C. 61º Annual Technical Conference and Exhibition, New Orleans, LA, E.U.A., 5 a 8 de outubro de 1986). Os hidrocarbonetos pesados na forma de depósitos de petróleo em reservatórios de petróleo estão distribuídos mundialmente. Estas reservas de petróleo são medidas em centenas de bilhões de barris recuperáveis. Pelo fato do petróleo bruto pesado possuir uma viscosidade relativamente alta, ele é essencialmente imóvel e não pode ser facilmente recuperados pelos meios convencionais primário e secundário.

MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*) é uma metodologia para aumentar a recuperação de petróleo pela ação de micro-organismos (Brown, L. R., Vadie, A. A., Stephen, O. J. SPE 59306, SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, Oklahoma, 3 a 5 de Abril de 2000). A pesquisa e o desenvolvimento Meor é um esforço em curso direcionado às técnicas em desenvolvimento para a utilização de micro-organismos para modificar as propriedades do petróleo bruto para beneficiar a recuperação do petróleo

(Sunde. E., Beeder, J., Nilsen, R. K. Torsvik, T., SPE 24204, SPE/DOE 8º *Symposium on enhanced Oil Recovery*, Tulsa, OK, E.U.A., 22 a 24 de abril de 1992).

Os métodos para a identificação de micro-organismos úteis nos processos Meor foram descritos. Estes métodos exigem a identificação de amostras retiradas de um poço de petróleo ou reservatório compreendendo um consórcio de micro-organismos e enriquecimento ou evolução das populações na amostra, em condições específicas com meios nutrientes definidos. Vide, o pedido de patente US 10/564365.

A degradação microbiana dos hidrocarbonetos também foi descrita, em condições aeróbia ou mista (aeróbia e anaeróbia), como um mecanismo para a redução da viscosidade do petróleo. A degradação nestas circunstâncias exige micro-organismos desenvolvidos e nutrientes específicos que não mostraram ser um meio econômico para melhorar a recuperação do petróleo (vide a patente US 5.492.828).

Assim, há uma necessidade em desenvolver métodos para: (1) identificar os micro-organismos que poderiam ser utilizados para aumentar a recuperação do petróleo em condições econômicas; (2) identificar os micro-organismos que podem crescer no petróleo em condições anaeróbias, sem a necessidade de suplementação de nutrientes ou enriquecimento a longo prazo de micro-organismos autóctones; e (3) utilização de ditos micro-organismos identificados, de forma custo-eficiente, para melhorar a recuperação do petróleo.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Os métodos descritos no presente atendem às necessidades identificadas acima, descrevendo os métodos de identificação de gêneros bacterianos autóctones (*indigenous*) e utilizando técnicas de identificação filogenética baseada na filogenia dos gêneros autóctones para selecionar

culturas bacterianas anaeróbias puras que respiram pela desnitrificação e que são capazes de crescer no petróleo sem suplementação de nutrientes complexos.

Além disso, os métodos são descritos para a utilização de ditas
5 culturas puras, sem enriquecimento ou desenvolvimento dirigido, para melhorar economicamente a recuperação do petróleo. Estas culturas puras são utilizadas para aumentar a recuperação do petróleo em uma ou mais das seguintes formas: (1) alteram a permeabilidade da formação subterrânea para melhorar a eficiência da varredura por água; (2) produzem biotensoativos que
10 diminuem as tensões superficiais e interfaciais; (3) mediam mudanças na molhabilidade; (4) produzem polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo; e (5) geram gases (principalmente o CO₂) que aumentam a formação de pressão e reduzem a viscosidade do petróleo.

Especificamente, a presente invenção se refere à aplicação de
15 tipagem filogenética por rDNA de bactéria encontrada em amostras ambientais obtidas a partir de um poço ou reservatório de petróleo, seguido pela identificação e obtenção de culturas puras de espécies de bactérias conhecidas com constituição genética similar, selecionando então tais linhagens para funcionalidades relevantes, tal como a capacidade de crescer em petróleo
20 bruto sob condições desnitrificantes.

Em uma realização, a presente invenção descreve um método para melhorar a recuperação de petróleo a partir de um poço de petróleo, que compreende:

- (a) fornecer uma amostra ambiental que compreende as
25 populações microbianas autóctones de dita amostra ambiental;
- (b) identificar o gênero microbiano presente em dita amostra ambiental por tipagem filogenética;
- (c) selecionar uma ou mais espécies de cultura pura conhecidas

do gênero identificado em (b), em que ditas espécies são capazes de crescer no petróleo; e

(d) identificar as funcionalidades relevantes das espécies de (c) para uso na melhoria da recuperação do petróleo.

5 Em um aspecto, a presente invenção determina que uma melhor recuperação do petróleo ocorre através da redução na viscosidade do petróleo bruto pelo crescimento de uma espécie de (c) possuindo certas funcionalidades identificadas na etapa (d) em um reservatório de petróleo, em que dito crescimento resulta na produção de qualquer um dos biotensoativos, dióxido de
10 carbono ou massa celular, e na degradação seletiva dos componentes de alto peso molecular no poço de petróleo ou suas combinações.

Em outra realização, a melhor recuperação de petróleo é aprimorada pelo crescimento de uma espécie de (c) que possui certas funcionalidades identificadas na etapa (d), em um poço de petróleo sob
15 condições anaeróbias e desnitrificantes, substancialmente sem corrosão da maquinaria de recuperação e processamento.

Em outra realização, o mapeamento filogenético é utilizado para prever os nutrientes necessários para estimular seletivamente o crescimento de determinadas espécies em detrimento de outras.

20 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

A presente invenção pode ser melhor compreendida a partir da seguinte descrição detalhada, Figura 1, e das descrições de sequência anexas, que fazem parte do presente relatório descritivo.

Figura 1 - Representa as concentrações de nitrato e nitrito (ppm)
25 após 36 dias de crescimento no petróleo bruto. O nitrato e nitrito foram medidos utilizando a cromatografia de troca iônica.

As seguintes sequências estão em conformidade com a norma 37 C.F.R. 1.821 – 1.825 (*Requirements for Patent Applications Containing*

Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules) e são consistentes com o padrão ST.25 (1998) do *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e os requisitos da listagem da sequência do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5 (a-bis), e na Seção 208 e no Anexo C das instruções administrativas. Os símbolos e formato utilizado para os dados da sequência de nucleotídeos e aminoácidos cumprem as regras estabelecidas na norma 37 C.F.R. § 1,822.

SEQ ID NO: 1 - 8F Início (forward)
AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'

SEQ ID NO: 2 - 1407R primer reverso 1407R-
GACGGGGGTGWGTRCAA-3'

A SEQ ID NO: 1 e a SEQ ID NO: 2 foram utilizadas para a amplificação dos genes de rDNA bacterianos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere aos métodos para a identificação de micro-organismos úteis para melhorar a recuperação do petróleo. Especificamente os métodos descritos no presente estão direcionados à geração de um mapa filogenético de micro-organismos a partir de um poço de petróleo e a utilização de dito mapa filogenético para identificar as culturas puras relacionadas úteis para melhorar a recuperação do petróleo, ou seja, as culturas que respiram por desnitrificação e são capazes de crescer no petróleo sem a suplementação de nutrientes complexos.

Além disso, os métodos são descritos para o uso de ditas culturas puras identificadas, sem o enriquecimento ou o desenvolvimento direcionado, para melhorar economicamente a recuperação do petróleo.

As culturas puras identificadas pelas metodologias reivindicadas são utilizadas para aumentar a recuperação do petróleo em uma ou mais das seguintes formas: (1) alterar a permeabilidade da formação subterrânea para

melhorar a eficiência da varredura de água; (2) produzir biotensoativos que diminuem as tensões superficiais e interfaciais; (3) mediar alterações na molhabilidade; (4) produzir polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo; e (5) gerar gases (principalmente o CO₂) que aumentam a pressão de formação e reduzem a viscosidade do petróleo; todos os quais beneficiam a recuperação e/ou o processamento do petróleo bruto pesado.

As seguintes definições são fornecidas através de termos especiais e abreviaturas utilizadas no presente pedido:

A abreviatura “PCR” se refere à reação em cadeia da polimerase.

10 A abreviatura “SDS” se refere ao dodecil sulfato de sódio.

A abreviatura “dNTPs” se refere ao desoxirribonucleotídeo trifosfato.

A abreviatura “ATCC” refere-se à American Type Culture Collection International Depository, Manassas, VA, E.U.A.. A abreviatura
15 “ATCC No.” se refere ao número de acesso às culturas no depósito com ATCC.

O termo “Sarcosil” é o detergente aniônico, ácido *N*-metilaminoacético.

A abreviatura “ASTM” se refere à American Society for Testing and Materials.

20 O termo “amostra ambiental” significa qualquer amostra exposta aos hidrocarbonetos, incluindo uma mistura de água e óleo. Conforme utilizado no presente, as amostras ambientais incluem as amostras de água e óleo, que compreendem os micro-organismos autóctones úteis no mapeamento filogenético dos gêneros presentes em uma determinada área de amostragem.

25 Os termos “poço de petróleo” e “reservatório de óleo” podem ser utilizados no presente indistintamente e se referem à formação subterrânea ou em leito marinho a partir do qual o petróleo que pode ser recuperado.

O termo “consórcio microbiano” significa uma mistura de micro-

organismos de diferentes espécies presente como uma comunidade que fornece um efeito sinérgico para aumentar a recuperação do petróleo.

O termo “populações microbianas” significa uma ou mais populações de micro-organismos presentes tanto nas amostras obtidas a partir dos poços de petróleo como em um inóculo para injeção em um poço de petróleo.

O termo “cresce no petróleo” significa que as espécies microbianas são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos ou outros compostos orgânicos do petróleo bruto como um nutriente para sustentar o crescimento.

Os termos “desnitrificantes” e “desnitrificação” significam a redução do nitrato para o uso na geração de energia respiratória.

O termo “eficiência de varredura” significa a capacidade da água injetada em ‘empurrar’ o petróleo através de uma formação geológica em direção a um poço produtor.

O termo “cultura pura” significa uma cultura derivada de uma única célula isolada de uma espécie microbiana. As culturas puras especificamente referidas no presente incluem aquelas que estão publicamente disponíveis em um depósito. As culturas puras adicionais são identificáveis pelos métodos descritos no presente relatório descritivo.

O termo “funcionalidades relevantes” significa a capacidade de reduzir nitritos e nitratos e crescer em condições anaeróbias; a capacidade de utilizar pelo menos um componente disponível no poço de petróleo como uma fonte de carbono; a capacidade de utilizar pelo menos um componente na água injetada ou produzida; a capacidade de atingir uma taxa de crescimento desejada na presença do petróleo; e a capacidade de crescer de forma ótima em um ambiente de poço de petróleo; e suas combinações.

O termo “biofilme” significa uma película ou “camada de

biomassa” de micro-organismos. Os biofilmes são muitas vezes incorporados em polímeros extracelulares, que se aderem às superfícies submersas em ambientes aquáticos, ou submetidas ao mesmo.

O termo “nitratos simples” e “nitritos simples” se referem ao nitrito
5 (NO₂) e ao nitrato (NO₃).

O termo “corrosão oxidativa” se refere à conversão química de um metal para um produto inferior, que ocorre na presença de ar (por exemplo, o oxigênio).

O termo “micro-organismos piezófilos” significa os micróbios que
10 crescem otimamente em alta pressão, por exemplo, os micróbios que não podem crescer a menos de 50 MPa (500 vezes a pressão atmosférica) de pressão, e crescem otimamente a 80 MPa (800 vezes a pressão atmosférica).

O termo “micro-organismos acidofílicos” significam os micróbios que crescem otimamente em condições ácidas – possuindo um crescimento
15 ótimo de pH abaixo de 6,0 e, por vezes tão baixo quanto o pH 1,0.

O termo “micro-organismos alcalifílicos” significa os micróbios que crescem otimamente em condições alcalinas - tipicamente exibindo um ou mais crescimento ótimo dentro do intervalo de pH 8 a 11 e que normalmente crescem lentamente ou não no pH 7,0 ou abaixo deste.

O termo “micro-organismos halofílicos” significam os micróbios
20 que crescem de forma ótima na presença de eletrólito (geralmente NaCl) em concentrações acima de 0,2 M e que tipicamente crescem pouco ou nada em baixas concentrações de eletrólitos.

O termo “micro-organismos psicofílicos” significa os micro-
25 organismos que crescem otimamente a uma temperatura de 20° C ou abaixo.

O termo “modificando o ambiente do poço de petróleo” inclui (1) alterar a permeabilidade da formação subterrânea (eficiência de varredura), (2) produzir biotensoativos que diminuem as tensões superficiais e interfaciais, (3)

mediar mudanças na molhabilidade, (4) produzir polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo; e (5) gerar gases (principalmente o CO₂) que aumentam a pressão de formação; e (6) reduzir a viscosidade do petróleo.

O termo “inoculação de um poço de petróleo” significa injetar uma ou mais populações de micro-organismos em um poço de petróleo ou reservatório de petróleo de tal forma que os micro-organismos são fornecidos ao poço ou reservatório sem perda da viabilidade total.

Os termos “tipagem filogenética”, “mapeamento filogenético” ou “classificação filogenética” podem ser utilizados intercambiavelmente o presente e se referem a uma forma de classificação na qual os micro-organismos são agrupados de acordo com sua linhagem ancestral. Os métodos mencionados são especificamente direcionados para a tipagem filogenética de amostras ambientais com base no sequenciamento do DNA ribossomal 16S (rDNA). Neste contexto, um comprimento total do par de bases de 1.400 (pb) da sequência do gene 16S rDNA é gerado utilizando os *primers* identificados no presente e comparados por homologia a uma base de dados de sequências de rDNA conhecida de micro-organismos conhecidos. Esta comparação é então utilizada para a identificação de culturas puras para o uso na recuperação aprimorada do petróleo.

Os termos “fontes de carbono adicionais” ou “nutrientes carbono complexos” podem ser utilizados intercambiavelmente no presente e se referem à adição de fontes de carbono na circunstância em que um micro-organismo é incapaz de crescer no petróleo sem o carbono adicional acrescentado.

O termo “suplementação de nutrientes” se refere à adição de nutrientes que beneficiam o crescimento de micro-organismos que são capazes de utilizar o petróleo como a sua principal fonte de carbono, mas crescer de forma otimizada com outros aditivos, tais como as fontes de carbono (com

exceção dos hidrocarbonetos), tais como o extrato de levedura, peptona, succinato, lactato, formiato, acetato, propionato, glutamato, glicina, lisina, citrato, glicose e soluções de vitamina.

O termo “espécies microbianas” significa micro-organismos distintos identificados com base em sua fisiologia, morfologia e características filogenéticas utilizando as sequências de 16S rDNA.

A abreviatura “NCBI” se refere ao National Center for Biotechnology Information.

A abreviatura “rDNA” se refere ao ácido desoxirribonucleico ribossomal.

A abreviatura “cDNA” se refere a uma fita dupla de DNA que é complementar ao RNA mensageiro e derivada do mesmo.

O termo “Archaeal” significa que pertence ao Archaea – Archaea são um reino de espécies microbianas separadas dos outros procariotos, com base em sua fisiologia, morfologia e homologias na sequência do 16S rDNA.

O termo “filogenético” se refere ao estudo do parentesco evolutivo entre os diferentes grupos de organismos (por exemplo, espécies, populações).

O termo “tipo de rDNA” significa o processo de utilização da sequência do gene que codifica o 16S rDNA para obter as espécies microbianas “mais familiares” por homologia com as sequências de rDNA mantida em várias bases de dados internacionais.

O termo “complementar” é utilizado para descrever a relação entre as bases de nucleotídeos que são capazes de hibridização entre si. Por exemplo, com relação ao DNA, a adenosina é complementar à citosina e a timina é complementar à guanina.

O termo “identidade percentual”, como é conhecido no estado da técnica, é uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou duas ou mais sequência de polinucleotídeos, conforme determinado pela

comparação das sequências. No estado da técnica, a “identidade” também significa o grau de parentesco das sequências entre as sequências de polinucleotídeo, conforme determinado pela correspondência entre as fitas de tais sequências. “Identidade” e “semelhança” podem ser facilmente calculadas

5 através de métodos conhecidos incluindo, mas não limitados, aos descritos em *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed. Oxford University Press, NY, 1988; e *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, NY, 1993; e *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, NJ, 1994; e *Sequence*

10 *Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., ed., Academic Press, 1987; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., Stockton Press, NY, 1991. Os métodos preferidos para determinar a identidade se destinam a fornecer a melhor correspondência entre as sequências testadas. Os métodos para determinar a identidade e a similaridade são codificados nos

15 programas de computador disponíveis publicamente.

O termo “software de análise da sequência” se refere a qualquer algoritmo de computador ou programa de software que seja útil para a análise dos nucleotídeos ou sequências de aminoácidos. O “software de análise da sequência” pode estar comercialmente disponível ou ser desenvolvido de forma

20 independente. O software de análise sequencial típica irá incluir, mas não está limitado a: o conjunto GCG de programas (Wisconsin Package versão 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215, 403 a 410, 1990), DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI), e o programa FASTA incorporando o algoritmo de Smith-

25 Waterman (Pearson, W. R., *Comput. Methods Genome Res.*, [Proc. Int. Symp, Meeting Date 1992, 111 – 120. eds: Suhai, Sandor. Editor: Plenum, New York, NY, 1994). Dentro do contexto do presente pedido, será entendido que, quando o software de análise da sequência for utilizado para a análise, os resultados

das análises serão baseados nos “valores *default*” do programa citado, salvo indicação em contrário. Conforme utilizado no presente “valores *default*” significará qualquer conjunto de valores ou parâmetros que carregar originalmente com o software quando inicializado pela primeira vez.

5 As abreviaturas adicionais utilizadas no presente relatório descritivo são as seguintes: “h” significa hora(s), “min” significa minuto(s), “dia” significa dia(s), “mL” significa mililitros, “mg/mL” significa miligrama por mililitro, “L” significa litros, “μL” significa microlitros, “mm” significa milimolar, “μM” significa micromolar, “pmol” significa picomol(s), “°C” significa graus
10 centígrados ou Celsius, “RT” significa temperatura ambiente, “bp” significa par de base, “bps” significa pares de bases, “kDa” significa kilodaltons. “EtOH” significa etanol, “μg/L” significa microgramas por litro, “v/v/v”, volume por volume por volume, “%” significa por cento, “nM” significa nano molar, “w/w” peso por peso, “ppm” significa parte por milhão.

15 TIPAGEM FILOGENÉTICA

Os métodos para a geração de sondas de oligonucleotídeos e microarranjo para a realização de análises filogenéticas são conhecidos pelos técnicos no assunto (Loy, A., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6998-700, 2004) e (Loy A. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5064-5081, 2002) e
20 (Liebich, J., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1688-1691, 2006). Estes métodos são aplicados no presente com a finalidade de identificar os micro-organismos presentes em uma amostra ambiental.

Especificamente, as sequências conservadas da região codificadora 16S ribossomal RNA do DNA genômico são utilizadas no
25 presente, no entanto, existem outras metodologias úteis para a tipagem filogenética observadas na literatura. Estas incluem: 23S rDNA ou genes A girase e/ou quaisquer outras sequências gênicas altamente conservadas. O 16S rDNA é comumente utilizado porque a base de dados de espécies

conhecidas comparativas é a maior até a presente data.

Os *primers* descritos no presente foram escolhidos como relevantes para as amostras ambientais a partir de um reservatório de petróleo (Grabowski, A., *et al.*, FEMS Micro Eco, 544, 427-443, 2005) e por 5 comparações com outros conjuntos de *primers* utilizados para outros estudos ambientais. Uma revisão dos *primers* disponíveis para uso no presente pode ser encontrada em Baker *et al.*, (GC Baker, GC *et al.*, *Review and re-analysis of domain-specific primers*, J. Microbiol. Meth., 55, 541-555, 2003). Quaisquer *primers* que geram uma parte ou toda a sequência do 16S rDNA seria 10 adequado para o método reivindicado.

A extração de DNA pela técnica fenol/clorofórmio é conhecida no estado da técnica e utilizada no presente como adequado para a extração de DNA a partir das amostras ambientais contaminadas com petróleo. No entanto, existem outras metodologias para extração de DNA na literatura que podem ser 15 utilizadas em conformidade com a presente invenção.

As metodologias de sequenciamento de DNA que geram >700 bases de sequências de alta qualidade podem ser utilizadas para o tipo de sequenciamento com base no plasmídeo de acordo com a presente invenção, em conjunto com uma sequência de programas de análise de qualidade. As 20 comparações por homologia utilizando os algoritmos BLAST para qualquer banco de dados abrangente de 16S rDNAs conseguiriam um resultado aceitável para a identificação dos gêneros de micro-organismos presentes na amostra ambiental. As bases de dados mais utilizadas são a ARB (Ludwig, W., *et al.*, *ARB: a software environment for sequence data*. Nucleic Acids Res., 32, 25 1363-1371, 2004) e NCBI.

AMOSTRAGEM DO POÇO DE PETRÓLEO PARA ESTUDOS FILOGENÉTICOS

As amostras utilizadas para este estudo foram obtidas conforme descritas no Exemplo 1. O DNA foi extraído de ditas amostras seguido pela

tipagem filogenética. As amostras ambientais para a tipagem ou mapeamento filogenético poderiam provir de qualquer água associada a um sistema de reservatório de petróleo, incluindo a água da tubulação e canos no poço de produção, os poços de injeção de água, os núcleos obtidos diretamente a partir da formação geológica com as águas subterrâneas associadas ou quaisquer outras fontes de água associadas. As amostras podem ser obtidas a partir de qualquer sistema de reservatório de petróleo. As amostras descritas no presente incluem as amostras ambientais a partir dos reservatórios de petróleo pesado no North Slope do Alasca, mas também poderia incluir reservatórios de petróleo pesado mesófilos semelhante na Rússia ou no Canadá ou quaisquer reservatórios de petróleo pesado termofílico na América do Sul, Mar do Norte, África, Mar do Golfo de qualquer outra localização de qualquer reservatório de petróleo possuindo qualquer temperatura ou perfil de viscosidade em todo o mundo.

SELEÇÃO DE CULTURAS PURAS

A seleção de culturas puras para a utilização neste estudo foi baseada nos gêneros descobertos no sistema de produção do reservatório do North Slope do Alasca. Os gêneros identificados a partir de amostras ambientais foram mapeados por filogenia e utilizados para selecionar culturas puras para uso na melhoria da recuperação do petróleo. As espécies de cultura pura descritas no presente foram escolhidas para uma análise com base no mapeamento filogenético conforme relacionado aos gêneros identificados nas amostras ambientais. A análise de ditas culturas resultou na identificação de culturas com a capacidade de respirar por desnitrificação e crescer no petróleo sem a adição de nutrientes de carbono complexos, bem como exibindo uma ou mais funcionalidades relevantes para o beneficiamento da recuperação de petróleo.

As culturas identificadas e utilizadas no presente estão disponíveis

pela American Type Culture Collection. Há muitas coleções de cultura pública global, tal como a coleção de cultura DMS baseada na Alemã ou a coleção USDA NRRL e a National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) na Inglaterra. Qualquer coleção de cultura publicamente disponível poderia ser utilizada para este tipo de seleção se ela contiver as espécies do gênero correto.

As culturas úteis para a seleção baseadas no parentesco das amostras ambientais também podem ser selecionadas para a análise das funcionalidades relevantes com base nas referências bibliográficas e na associação com o petróleo ou com os componentes do petróleo.

PROPRIEDADES DO GÊNERO OBSERVADO NO SISTEMA DE RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO

O processo clássico de enriquecimento dos isolados de micro-organismos ambientais sobre um substrato de interesse, ou seja, o petróleo bruto, na cultura anaeróbia, requer amplos períodos de crescimento e múltiplas transferências sequenciais. Ao utilizar a informação obtida a partir da análise filogenética do poço de petróleo alvo descrito acima, esta abordagem laboriosa pode ser contornada. A literatura pode ser citada para restringir a seleção de espécies dos gêneros identificados como sendo parte da população nativa do sistema de água do reservatório de petróleo, ou as espécies podem ser selecionadas de forma aleatória, ou quanto à sua disponibilidade como uma cultura pura. Esses micro-organismos, que são identificáveis como culturas puras nas propriedades do ATCC ou algum outro depositário, podem ser adquiridos e analisados quanto às funcionalidades relevantes, incluindo a capacidade de degradar o petróleo bruto nas condições de interesse.

Em um aspecto dos métodos descritos no presente, diversas culturas bacterianas puras conhecidas foram selecionadas com base em suas semelhanças filogenéticas com as espécies nativas microbianas associadas. Pode ser feita uma consideração com relação às culturas puras conhecidas

identificadas como sendo isoladas de um ambiente de hidrocarbonetos ou outros locais pertinentes, ou alegadamente possuindo alguma capacidade de afetar os hidrocarbonetos.

TABELA 1

5 **LISTA DE CEPAS OBTIDAS A PARTIR DO ATCC E TESTADAS QUANTO AO**
CRESCIMENTO EM PETRÓLEO OU NOS COMPONENTES DO PETRÓLEO

Micro-organismo	ATCC#	Capacidades metabólicas explicadas
<i>Comamonas terrigena</i>	14635	Decompõe o fenol e o <i>m</i> -cresol
<i>Fusibacter paucivorans</i>	700852	Reduz o tiosulfato do poço de produção do petróleo, encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Marinobacterium georgiense</i>	33635	Encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Petrotoga miotherma</i>	51224	Da água salgada do reservatório de petróleo, encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Shewanella putrefaciens</i>	51753	De Oleodutos da Alberta Canadá, tetraclorometano desalogenado, encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BAA-172	Cepa OX1, degrada o tolueno/ xileno aerobicamente, isolados do lodo
<i>Vibrio alginolyticus</i>	14582	Creosoto tolerante
<i>Thauera aromatica S100</i>	700265	Isolado do solo contaminado por petróleo CA, degrada o tolueno, fenol
<i>Thauera aromatica T1</i>		Tolueno, degradação do fenol

As culturas puras conhecidas, uma vez identificadas como pertencentes a gêneros relevantes para um reservatório de petróleo (conforme determinado pela tipagem filogenética), podem ser testadas quanto às funcionalidades relevantes pelos testes de diagnóstico convencionais, tais como o crescimento em meios seletivos para desnitrificantes, fermentadores, redutores de sulfato, metanógenos, acetogênicos e outros fenótipos fisiológicos.

No Exemplo 5, as cepas ATCC que crescem dentro ou sobre o petróleo bruto em condições anaeróbias desnitrificantes foram identificadas.

Conforme descrito no Exemplo 5, todas as cepas exceto o *Clostridium amygdalium* cresceram em condições desnitrificantes utilizando o petróleo como única fonte de carbono. O *Marinobacterium georgiense* não era previamente conhecido por crescer de forma anaeróbia em condições desnitrificantes na presença de óleo. O *Comamonas terrigena*, uma bactéria do solo, (originalmente apresentada como uma espécie *Vibrio*) era um desnitrificante facultativo conhecido, mas não tinha sido relatado pelo fato de crescer sobre os componentes do petróleo. Embora as espécies *Comamonas* sejam conhecidas para degradar o fenol em condições aeróbias (Watanabe, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1203-1209, 1998), a sua capacidade de crescer no petróleo em condições anaeróbias não havia sido relatada previamente. A *Petrotoga miotherma*, uma bactéria termofílica e anaeróbia estrita conhecida, era conhecida por reduzir o sulfato e o tiossulfato na presença de petróleo em temperaturas de moderadas a altas (Davey, M. E., *Syst. Appl. Microbiol.*, 16, 191 - 200, 1993) e, (Lien, T., et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 1007-1013, 1998). No entanto, este organismo não era conhecido por utilizar o nitrato como um aceptor de elétrons.

A *Thauera aromatica* T1 cresce em tolueno e fenol em condições desnitrificantes (Breinig, S. et al., *J. Bacteriol.*, 182, 5849-5863, 2000) e

(Leuthner, B., *et al.*, *J. Bacteriol.*, 182, 272-277, 2000) e a *Thauera chlorobenzoica* degrada o fluoro-, cloro-, e bromobenzoato em condições aeróbias e desnitrificantes (Song, B. *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 589-602, 2001). Apesar os componentes aromáticos simples do petróleo possam sustentar o crescimento das espécies *Thauera*, o seu crescimento na presença de petróleo bruto não havia sido documentado. A *Shewanella putrefaciens* reduz de forma anaeróbia os metais oxidados, tais como ferro e manganês. (Nealson, KH, *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 48, 311-343, 1994) e também pode utilizar uma variedade de redutores, incluindo o nitrato e nitrito (Nealson, KH, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1551-1554, 1995). Embora a *Shewanella* tenha sido relatada como estando associada às amostras do reservatório de petróleo, não foi demonstrado previamente que ela cresce nos componentes do petróleo diretamente. Algumas espécies de *Pseudomonas stutzeri*, em condições aeróbias, degradam o tolueno, fenol, xileno, naftaleno e compostos relacionados ao naftaleno (Bertoni, G. M., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3626-3632, 1998). Uma cepa específica do *P. stutzeri* degrada de forma anaeróbia o naftaleno em condições desnitrificantes (Rockne, K. J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1595-1601, 2000). Portanto, as variantes de *P. stutzeri* podem possuir uma maior probabilidade de ser capaz de crescer nos componentes do petróleo. O micro-organismo que degrada a lignina, o *Microbulbifer hydrolyticus*, não havia sido relatado como sendo anaeróbio, nem redutor do nitrato.

O Exemplo 5 apresenta detalhes do crescimento de algumas dessas cepas em diversos componentes do petróleo ou frações. Uma vez que múltiplas cepas poderiam crescer e acumular biomassa utilizando algum componente do petróleo bruto como uma fonte de carbono, estas cepas podem ser utilizadas para acumular biomassa em um reservatório na presença do acceptor de elétrons e dos aditivos do crescimento adequados.

Portanto, os exemplos a seguir apresentam meios para identificar os micro-organismos que poderiam ser utilizados para aumentar a recuperação de petróleo em condições economicamente viáveis sem a necessidade de qualquer suplementação de nutrientes, ou a seleção através do enriquecimento a longo prazo.

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda definida nos exemplos a seguir. Deve ser entendido que estes exemplos, embora indiquem as realizações preferidas da presente invenção, são dadas apenas como título de ilustração. A partir da discussão acima e dos exemplos descritos a seguir, um técnico no assunto pode conhecer as características essenciais da presente invenção, e sem se afastar de seu espírito e escopo, pode realizar diversas alterações e modificações da presente invenção para adaptá-lo aos vários usos e condições.

COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

As amostras de petróleo/ água foram obtidas a partir dos poços de petróleo no North Slope do Alasca e o sequenciamento do DNA ribossomal 16S foi utilizado para identificar os organismos procarióticos presentes nesta mistura de petróleo/ água. Depois de examinar os resultados da análise da comunidade de espécies bacterianas nestas amostras, diversas outras espécies semelhantes ou espécies do mesmo gênero, incluindo aquelas associadas aos outros estudos do petróleo, da ATCC (Tabela 1) para incluir nos exemplos a seguir, foram selecionadas. Estas bactérias foram então utilizadas em uma tela para o crescimento anaeróbico, na presença de petróleo. Foi demonstrado que várias espécies crescem no petróleo, conforme determinado pela quantificação da degradação do nitrato por cromatografia de íons (Tabela 3).

A capacidade de crescer em condições desnitrificantes, utilizando

os componentes do petróleo como substratos de carbono, foi inesperada para várias dessas espécies. Por exemplo, não houve relatos anteriores da capacidade de um *Marinobacterium* em reduzir o nitrato ou crescer anaerobiamente em petróleo bruto. O *Fusibacter* não foi relatado como sendo
5 capaz de desnitrificação ou de utilização do petróleo bruto para o crescimento.

CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS

As técnicas para o crescimento e manutenção das culturas anaeróbias são descritas em *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*, (Labeda, D. P., ed. págs 117 a 140, McGraw-Hill Publishers, 1990). O
10 crescimento anaeróbico é medido através da degradação do nitrato do meio de crescimento ao longo do tempo. O nitrato é utilizado como aceptor de elétron primário, nas condições de crescimento utilizadas na presente invenção. A redução do nitrato a nitrogênio foi descrito previamente (Moreno-Vivian, C., *et al.*, *J. Bacteriol.*, 181, 6573-6584, 1999). Em alguns casos, os processos de
15 redução do nitrato levam à acumulação do nitrito que é posteriormente reduzido a nitrogênio. Portanto, o acúmulo de nitrito é também considerado uma evidência do crescimento ativo e metabolismo de micro-organismos.

ELETROFORESE EM GEL

Os materiais e métodos adequados para a eletroforese em gel
20 podem ser encontrados em *Current Protocols in Molecular Biology*. Os reagentes foram obtidos, salvo indicação em contrário, pelo Invitrogen (Carlsbad, CA), Biorad (Hercules, CA) ou Pierce Químicos (Rockford, IL).

CROMATOGRAFIA IÔNICA

Para quantificar os íons nitrato e nitrito no meio aquoso, uma
25 unidade de cromatografia ICS2000 (Dionex, Banockburn, IL) foi utilizada. A troca iônica foi realizada em uma coluna de troca aniônica AS15 utilizando um gradiente de hidróxido de potássio. As curvas padrão foram geradas e utilizadas para a calibração das concentrações de nitrato e nitrito.

EXEMPLO 1

EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RESERVATÓRIO

As amostras de água foram obtidas a partir das cabeças do poço de produção, enquanto misturadas em líquidos de petróleo/ água em garrafas de vidro marrom de 1,0 L, cheias até o topo, tampadas e seladas com fita adesiva para evitar a fuga de gás. O gás dos processos anaeróbios inerentes é suficiente para manter as condições anaeróbias durante o transporte. As garrafas foram transportadas em caixas térmicas de plástico grandes preenchidas com blocos de gelo para as instalações de teste em 48 h de amostragem.

Após o estabelecimento durante a noite e a separação das camadas de petróleo/ água, 1 a 4 litros de água foram removidos de várias garrafas por pipetagem e filtradas através de filtros de fibra de vidro Whatman # 1 (Brentford, Inglaterra) em uma unidade de filtro de chaminé de vidro de 47 mm. O filtro da fibra de vidro coletou petróleo residual, resíduos e células microbianas superiores a 10 µm. Posteriormente, a água foi filtrada através de filtros de náilon estéril de 0,22 µm Supor (Pall Corporation, Ann Arbor, MI) sob vácuo. As células microbianas coletadas nos filtros de fibra de vidro ou os filtros Supor foram ressuspensos em 4 mL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0) e misturados com um misturador Vortex por 60 s. Os reagentes foram adicionados a uma concentração final de 2,0 mg/mL de lisozima, 10 mg/mL de dodecil sulfato de sódio e 10 mg/mL de sarcosil para lisar as células. Após uma nova mistura utilizando um misturador Vortex, 0,1 mg/mL de RNase e 0,1 mg/mL de proteinase K foram adicionados para remover os contaminantes de RNA e proteínas. A mistura foi incubada a 37° por 1,0 h.

Após a incubação, os filtros foram retirados e um volume equivalente de fenol:CHCl₃:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) foi adicionado aos

tubos. As amostras foram extraídas duas vezes com fenol:CHCl₃:álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com CHCl₃:álcool isoamílico (24:1). Para a camada aquosa, 1/10 do volume de 5,0 M NaCl e dois volumes de etanol a 100% foram adicionados e misturados. Os tubos foram congelados a -20° C durante 16 horas e em seguida, centrifugados a 15.000 xg por 30 min para peletizar o DNA cromossômico. Os *pellets* foram lavados uma vez com etanol 70%, centrifugados a 15.000 xg por 10 minutos, secos, ressuspensos em 100 µL de água deionizada e armazenados a -20° C.

EXEMPLO 2

GERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE PCR rDNA

Para gerar o rDNA dos fragmentos amplificados por PCR representativos das espécies microbiana nas amostras de DNA em pool, optou-se por conjuntos de *primers* de Grabowski *et al.*, (acima). A combinação do *primer* de início SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 foi selecionada especificamente para amplificar as sequências de rDNA bacteriano.

A combinação por PCR incluía: t ampão PCR 1,0 X GoTaq (Promega), 0,25 mm de dNTPs, 25 pmol de cada *primer*, em um volume de reação 50 µL. 0,5 µL de polimerase GoTaq (Promega) e 1,0 µL (20 ng) de DNA da amostra foram adicionados. O protocolo de termociclagem da reação PCR era de 5,0 min a 95° C seguido por 30 ciclos de: 1,5 min a 95° C, 1,5 min a 53° C, 2,5 min a 72° C e extensão final por 8 min a 72° C em um Perkin Elmer 9600 termociclador (Waltham, MA). Este protocolo também foi utilizado com as células de quaisquer colônias purificadas ou espécies misturadas de culturas de enriquecimento.

Os produtos de amplificação de pares de base de 1400 foram visualizados em 1,0% de géis de agarose. A mistura de reação PCR foi utilizada diretamente para a clonagem no vetor pPCR-Topo4 utilizando o sistema de clonagem TOPO TA (Invitrogen) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA foi transformado em células

quimicamente competentes TOP10 selecionadas para a resistência à ampicilina. As colônias individuais foram coletadas e cultivadas em placas de microtitulação para análise das sequências.

EXEMPLO 3

PREPARAÇÃO DO MOLDE DO PLASMÍDEO

Os sistemas de purificação dos moldes automáticos em larga escala utilizaram a Imobilização de Fase Reversível Sólida (Agencourt, Beverly, MA) (DeAngelis, M. M., *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 23, 4742-4743, 1995) A tecnologia SPRI® utiliza partículas revestidos com carboxilato, de núcleo de ferro, paramagnéticas, para capturar o DNA de um fragmento de comprimento desejado com base nas condições moduladas pelo tampão. Uma vez que o DNA desejado é capturado nas partículas, ele pode ser magneticamente concentrado e separado de modo que os contaminantes podem ser lavados.

Os moldes do plasmídeo foram purificados utilizando um protocolo simplificado SPRI SprintPrep® (DNA Agencourt). Este procedimento coleta o DNA do plasmídeo diretamente das culturas de bactérias lisadas ao aprisionar ambos o DNA genômico e plasmidial nas partículas do grânulo funcionalizado e eluindo seletivamente somente o DNA plasmidial. Resumidamente, o processo de purificação envolve a adição do tampão de lise alcalina (contendo RNase A) na cultura bacteriana, a adição de álcool com base no reagente de precipitação, incluindo partículas paramagnéticas, a separação das partículas magnéticas utilizando o anel personalizado com base nas placas do separador magnético, 5x a lavagem dos grânulos com 70% de ETOH e eluição do DNA plasmidial com água.

EXEMPLO 4

SEQUENCIAMENTO DO rDNA, MONTAGEM DE CLONES E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os moldes de DNA foram sequenciados em uma placa de 384

cavidades utilizando as reações Big Dye® Versão 3,1 nos instrumentos ABI3730 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). A ciclagem térmica foi realizada utilizando um termociclador de 384 cavidades. As reações de sequenciamento foram purificadas utilizando o corante Agencourt's CleanSeq®
 5 - kit de remoção terminador (Agencourt), como recomendado pelo fabricante. As reações foram analisadas utilizando um sequenciador capilar modelo ABI3730XL através de um módulo de execução prorrogado desenvolvido na Agencourt. Todas as leituras foram processadas utilizando o software de chamada base Phred (Ewing *et al.*, *Genome Res.*, 8, 175-185, 1985) e
 10 constantemente monitoradas com relação às métricas de qualidade.

MONTAGEM DOS CLONES DE rDNA

Um arquivo para cada clone de rDNA foi gerado. A montagem da sequência de dados gerada para os clones de rDNA foi realizada pelo programa de montagem PHRAP (Ewing, *et al.*, *Genome Research* 8, 175-185,
 15 1985).

As propriedades das letras geram uma sequência consenso e arquivos com qualidade de consenso para mais uma leitura da sequência de sobreposição.

ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE rDNA

Cada sequência de montagem foi comparada com o NCBI (banco de dados rDNA; cerca de 260.000 sequências de rDNA) utilizando o programa de algoritmo BLAST (Altschul, acima). O acionamento de BLAST foi utilizado para agrupar as sequências em agrupamentos (*clusters*) de homologia com pelo menos 98% de identidade com o mesmo fragmento de rDNA NCBI. Os
 25 agrupamentos de homologia foram utilizados para calcular a proporção de determinada espécie, em qualquer amostra. Pelo fato da amplificação e dos protocolos de clonagem serem idênticos para a análise de cada amostra, as proporções podem ser comparadas de amostra para amostra. Isto permitiu

comparações das diferenças de população em amostras obtidas em diferentes épocas, locais, seleções de enriquecimento ou colônias isoladas.

ANÁLISES FILOGENÉTICAS DO DNA RIBOSSÔMICO (PEQUENA SUBUNIDADE DO rDNA)

5 Uma sequência representativa de cada agrupamento de homologia foi selecionada para gerar a árvore de relações filogenéticas. A subunidade pequena (SSU) das sequências de rDNA foram alinhadas com suas afiliadas taxonômicas mais próximas no banco de dados de referência SILVA (liberação de 90, <http://silva.mpi-bremen.de/>) utilizando a ferramenta
10 ARB_EDIT4 no programa ARB (Ludwig, W. *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 32, 1363-1371, 2004); as atribuições taxonômicas foram verificadas através do exame das sequências pela ferramenta Sequence Match no Ribosomal Database Project (RDP) II (Cole, J. R., *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 33, D294-D296, 2005).

TABELA 2

15 **LISTA DE GÊNEROS ENCONTRADOS NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DO RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO DO ALASCA. GÊNERO EM ITÁLICO CORRESPONDENTE AOS ISOLADOS DA**

CULTURA DO ATCC UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Gêneros identificados no sistema de reservatório de petróleo do Alasca utilizando as comparações de sequência de rDNA
Não classificados e Thermotogae
<i>Chloroflexi</i>
Petratoga/ Thermatogae
Proteobactéria, gama

Gêneros identificados no sistema de reservatório de petróleo do Alasca utilizando as comparações de sequência de rDNA
<i>Shewanella</i>
<i>Vibrio</i>
<i>Marinobacterium</i>
<i>Pseudomonas</i>
Proteobactéria, épsilon
<i>Arcobacter</i>
<i>Agrobacterium</i>
Proteobactéria, delta
<i>Desulfolobus</i>
<i>Flexistipes/Deferribacter, delong</i>
<i>Desulfocaldus</i>
<i>Desulfomicrobium</i>
<i>Actinobacter</i>
<i>Pelobacter</i>
Bacteroides, não classificados, espiroquetas
<i>Bacteroides</i>

Gêneros identificados no sistema de reservatório de petróleo do Alasca utilizando as comparações de sequência de rDNA
Grupo WS6
<i>Spirochaeta</i>
Firmicutes
<i>Acetobacterium</i>
<i>Alkalibacter</i>
<i>Fusibacter</i>
<i>Fusibacter paucivorans</i>
<i>Desulfobacterium</i>
<i>Clostridium</i>

EXEMPLO 5

SELEÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS DO ATCC PARA O CRESCIMENTO NO PETRÓLEO OU COMPONENTES DO PETRÓLEO

As amostras liofilizadas obtidas a partir do ATCC foram revividas e cultivadas de acordo com os procedimentos recomendados, e as alíquotas foram utilizadas como inóculos para estudos experimentais e de crescimento controle. Um meio com sal mínimo geralmente utilizado para o crescimento de bactérias desnitrificantes (Tabela 3) foi utilizado para cultivar vários organismos testados neste exemplo. A fonte de carbono e energia para o crescimento foi fornecida por qualquer petróleo bruto autoclavado ou uma mistura de 0,25% de extrato de levedura, 0,2% de succinato que foi utilizado como controle positivo. O nitrato de sódio (NO₃ em cerca de 1.200 ppm) foi adicionado como o

receptor de elétrons primários. O meio foi desoxigenado por pulverização dos frascos preenchidos com uma mistura de nitrogênio e dióxido de carbono, seguido pela autoclavagem. Todas as manipulações de bactérias foram realizadas em uma câmara anaeróbia (Coy Laboratories Products, Inc. Grass Lake, 5 ML). O crescimento anaeróbio a 25° C foi monitorado pela observação da turvação visual, tanto nos frascos e na redução do nitrato por duas semanas. A cromatografia iônica foi utilizada para medir os níveis semanais de nitrato e nitrito.

TABELA 3**MEIO COM SAL MÍNIMO**

Componente de crescimento	Concentração final	Fonte química
Nitrogênio	18,7 µM	NH ₄ Cl
Fósforo	3,7 µM	KH ₂ PO ₄
Magnésio	984 µM	MgCl ₂ .6H ₂ O
Cálcio	680 µM	CaCl ₂ .2H ₂ O
Cloreto de sódio/ Iodeto de sódio	172 mM 1%	NaCl NaI
Metais traço		
	670 µM	ácido nitrilotriacético
	15,1 µM	FeCl ₂ .4H ₂ O
	1,2 µM	CuCl ₂ .2H ₂ O
	5,1 µM	MnCl ₂ .4H ₂ O
	12,6 µM	CoCl ₂ .6H ₂ O
	7,3 µM	ZnCl ₂
	1,6 µM	H ₃ BO ₃
	0,4 µM	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
	7,6 µM	NiCl ₂ .6H ₂ O

Componente de crescimento	Concentração final	Fonte química
pH tampão (7,5 final)	10 mM	Hepes
Selenium-Tungstato	22,8 nM	$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	24,3 nM	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Bicarbonato	23,8 nM	NaHCO_3
Vitaminas	100 µg/L	Vitamina B12
	80 µg/L	ácido <i>p</i> -aminobenzoico
	20 µg/L	Ácido nicotínico
	100 µg/L	Pantotenato de cálcio
	300 µg/L	Hidrocloreto de piridoxina
	200 µg/L	Tiamina-HCl.2H ₂ O
	50 µg/L	Ácido alfa-lipoico
Aceptor de elétrons	0,4 g/L	NaNO_3

O pH do meio foi ajustado para 7,5.

Várias das bactérias listadas na Tabela 1 utilizaram componentes de petróleo bruto, em condições desnitrificantes, como a única fonte de carbono para o crescimento. O crescimento foi determinado pela visualização da turbidez e redução do nitrato e os resultados são apresentados na Tabela 4. A turbidez foi observada e as amostras coletadas a partir de 7 dias após a inoculação. As culturas que estavam turvas no dia 7 foram classificadas com uma taxa de crescimento relativo de 1 (mais rápido). Os valores fracionários indicam os tempos proporcionalmente mais longos até a turbidez ser observada. A taxa de crescimento relativo com base nos níveis de nitrato foi definida pela fixação do número relativo da taxa de crescimento de 1 para aquelas culturas que reduziram os 250 ppm de nitrato disponíveis no dia 7. Os valores fracionários indicam tempos proporcionalmente mais longos para

completar a redução do nitrato.

TABELA 4

A taxa de crescimento relativo foi definida como 1/ dias até uma turbidez observável e taxa relativa da degradação total do nitrato quando o petróleo era a única fonte de carbono. Um valor de 1 indica turbidez ou redução completa do nitrato no dia 7.

Micro-organismos	Taxa de crescimento relativo da turbidez	Taxa de crescimento relativo de redução de nitrato
<i>Clostridium amygdalinum</i>	0	0
<i>Comamonas terrigena</i>	1	0,5
<i>Marinobacterium georgiense</i>	0,25	1,0
<i>Microbulbifer hydrolyticus</i>	1	0,5
<i>Petrotoga miotherma</i>	0,125	0,5
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	0,5
<i>Thauera aromatica T1</i>	0,25	1,0
<i>Thauera aromática S100</i>	0,25	0,5
<i>Thauera chlorobenzoica</i>	1	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0,3

A *Marinobacterium georgiense* (ATCC # 33635), *Thauera aromatica T1* (ATCC # 700265) e *Thauera chlorobenzoica* (ATCC # 700723) todos reduziram o nitrato no dia 7. Além disso, a *Petrotoga miotherma* (ATCC # 51224), *Shewanella putrefaciens* (ATCC # 51753), *Thauera aromatica S100* (ATCC # 700265), *Comamonas terrigena* (ATCC # 14635), e *Microbulbifer hydrolyticus* (ATCC # 700072), utilizaram todos os nitratos disponíveis no dia 14. Várias das espécies também haviam acumulado nitrito no dia 7, incluindo a *Marinobacterium georgiense*, *Thauera aromatica T1*, *Thauera chlorobenzoica*,

Shewanella putrefaciens e *Thauera aromatica* S100. Por volta do dia 14, a *Microbulbifer hydrolyticus* e a *Comamonas terrigena* também acumularam nitrito. A *Clostridium amygdalinum* (#BAA501) não cresceu no petróleo, mas cresceu com extrato de levedura e succinato.

- 5 A maioria das cepas identificadas utilizando este processo cresceu no petróleo em condições desnitrificantes.

EXEMPLO 6

DESCOBERTA DOS COMPONENTES DO PETRÓLEO UTILIZADOS COMO SUBSTRATOS DO CARBONO POR ESPÉCIES ISOLADAS

- 10 Algumas das linhagens ATCC descritas na Tabela 1 foram cultivadas na presença de vários substratos modelo do componente do petróleo, em condições desnitrificantes. Os seguintes substratos foram examinados: decano, representante dos hidrocarbonetos de cadeia longa; tolueno, representante dos hidrocarbonetos aromáticos simples; naftaleno
- 15 representante dos hidrocarbonetos poliaromáticos, uma fração “aromática” que era uma mistura de hidrocarbonetos poli aromáticos de alto peso molecular provenientes da destilação do petróleo bruto utilizando a norma ASTM D2892 e coletando a fração não destilada deste procedimento e utilizando a norma ASTM D4124-01 desta fração não destilada para produzir uma fração
- 20 aromática pesada (*Manual on Hydrocarbon Analysis*: 6ª edição, A. W. Drews, editor, Impresso por ASTM, West Conshohocken, PA, 19428-2959, 1998.). a fração “aromática” continha 0,23% de tolueno como um aditivo para a ressuspensão.

- 25 Como no Exemplo 5, as culturas foram monitoradas para o crescimento (turbidez) e redução do nitrato (concentrações de nitrato e nitrito). A fim de observar as alterações na composição do petróleo após a exposição a longo prazo para o crescimento da cultura bacteriana, o meio de crescimento foi suplementado com nitrato adicional, a medida que o nitrato inicial foi

degradado.

A bactéria para inoculação do sistema teste foi cultivada, conforme recomendado pelo ATCC no meio otimizado para determinadas espécies. As espécies incluídas neste estudo foram: *Marinobacterium georgiense*, *Thauera aromatica* T1, *Thauera chlorobenzoica*, *Petrotoga miotherma*, *Shewanella putrefaciens*, *Thauera aromatica* S100, *Comamonas terrigena* e *Microbulbifer hydrolyticus* (Tabela I). As culturas (4,0 mL) foram centrifugadas (10.000 xg, 5 a 7 min, temperatura ambiente), em condições anaeróbias, em uma microcentrífuga e os *pellets* foram ressuspensos em 4,0 mL de meio com sal mínimo (Tabela 3) utilizando uma seringa e uma agulha 18. As células foram lavadas duas vezes utilizando este processo antes de serem ressuspensas em 3,0 mL do meio e 0,5 mL desta suspensão foi utilizado para inocular cada frasco experimental.

Todos os meios, culturas e protocolos de amostragem eram como no Exemplo 5. O nitrato de sódio foi adicionado ao meio de sal mínimo em uma concentração de 0,4 g/L, que se traduz em 250 ppm de nitrato. Um controle de crescimento positivo que consiste em 0,25% de extrato de levedura e 0,2% de succinato foi incluído no teste. O decano e o tolueno filtro foram esterilizados (0,2 µm, filtros Supor) e desgaseificados com gás misto de nitrogênio/ dióxido de carbono. O naftaleno foi dissolvido em tolueno a 500 mg/L, filtro esterilizado, e 15 µm desta solução foram adicionados a frascos esterilizados. Os frascos foram secos durante a noite para evaporar o tolueno e colocados na câmara anaeróbia para estabilizarem durante várias horas antes de cultura ser adicionada. A fração “aromática” do petróleo (elaborado utilizando a norma ASTM D4124-01 na fração não destilada do procedimento ASTM D2892, acima) e o petróleo bruto inteiro foram desgaseificados então autoclavados. Em condições anaeróbias, alíquotas de 15 mL do meio foram combinadas com células lavadas e ressuspensas em frascos de soro estéril de 20 mL. Além

disso, 0,25% de extrato de levedura e 0,2% de succinato, 0,1% de decano, 0,03% de tolueno, ou 0,0050% de naftaleno foram adicionados. Para os hidrocarbonetos complexos, 10 mL do meio acrescido das células foram adicionados aos frascos e 5,0 mL de 10% da fração “aromática” (w/w) em hexametilnonano, como uma fase orgânica inerte ou 5,0 mL de petróleo bruto foram adicionados.

A turbidez foi monitorada visualmente. O nitrato e o nitrito foram determinados por cromatografia iônica, conforme descrito acima. O nitrato de sódio (350 ppm de concentração final) foi adicionado ao nitrato inicial e foi degradado em até 50 dias. Vários micro-organismos reduziram o nitrato ao crescer em qualquer um do substrato modelo, da fração “aromática” ou do petróleo bruto. Nas culturas de alguns micro-organismos que utilizaram o nitrato, um pouco de nitrito acumulou, no entanto, a maioria do nitrogênio foi provavelmente reduzida em nitrogênio (N₂).

O crescimento estava relacionado à degradação do nitrato e ao acúmulo de nitrito. Apenas o *Shewanella* e *T. aromatica* S100 apresentaram um crescimento limitado no decano conforme determinado pela redução mínima do nitrato. *Marinobacterium*, *Shewanella*, *Thauera* S100, *Thauera aromatica*, *T. chlorobenzoica* e *Petrotoga* tiveram um crescimento limitado em tolueno. O naftaleno sustentou algum crescimento do *T. aromatica* S100. O crescimento do *Marinobacterium* e *Thauera* T1 na fração “aromática” do petróleo foi acompanhado pela degradação completa do nitrogênio. A *Shewanella* e *T. chlorobenzoica* também depletaram o nitrato, quando cultivada no petróleo bruto, mas teve um crescimento limitado na fração “aromática”. A Figura 1 mostra as medidas de nitrato/ nitrito após 36 dias de crescimento no petróleo bruto. O *Microbulbifer* e *Marinobacterium* apresentaram degradação constante de nitrato no petróleo, com um acúmulo simultâneo de nitrito. O nitrito acumulou por 36 dias, mas foi ainda reduzido em 50 dias pela

Shewanella, *T. aromatica* T1 e *T. chlorobenzoica*.

EXEMPLO 7

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS PARA A MELHOR LIBERAÇÃO DO PETRÓLEO

TESTE DE LIBERTAÇÃO DO PETRÓLEO EM COLUNA DE MICROAREIA

5 As cepas de bactérias isoladas foram examinadas utilizando um teste de coluna de microareia para visualizar a liberação do petróleo. Uma coluna de microareia consiste em uma pipeta Pasteur de vidro invertida contendo areia do mar (EMD chemicals, La Jolla, CA), que tinha sido revestido com petróleo bruto e deixado envelhecer por pelo menos uma semana.

10 Especificamente, 280 mL de areia estéril e 84 mL de petróleo esterilizado (o mesmo petróleo utilizado nos Exemplos 2 a 5) foram combinados em um ambiente anaeróbico. A mistura foi agitada por 5 minutos, duas vezes por dia e deixada envelhecer por seis dias, sob nitrogênio. Os barris de pipetas Pasteur de vidro foram cortados na metade da altura e autoclavados. O

15 corte final da pipeta foi mergulhado na mistura de areia e petróleo e preenchida no núcleo a cerca de 1,0 polegada. O corte final da pipeta contendo a mistura de petróleo/ areia foi então colocado em um tubo de teste de vidro contendo as culturas microbianas. O aparelho foi selado dentro de frascos de vidro em um ambiente anaeróbico e a liberação do

20 petróleo a partir da areia foi observada no final selado de cada pipeta (Figura 2). O petróleo liberado da areia é coletado na boca estreita da pipetas Pasteur ou como gotas sobre a superfície da camada de areia. Presume-se que as culturas que melhoraram a liberação do petróleo do fundo (meio estéril) alteraram a interação do petróleo com a superfície da

25 areia e poderiam agir para melhorar a recuperação do petróleo em um reservatório de petróleo.

Neste exemplo, o inóculo foi cultivado até a turbidez utilizando o meio com sal mínimo apresentado na Tabela 2, com 0,4% de succinato como

fonte de carbono ou no caldo Luria. A concentração de cada espécie, listada na Tabela 4 abaixo, foi normalizada em OD₆₀₀ de 1,0 ou diluída 1:10 para um OD₆₀₀ final de 0,1. Todas as operações de preparação das colunas de microareia, inoculação e crescimento foram realizadas utilizando as técnicas estéreis em um saco de luvas anaeróbias. O inóculo (4 mL) do OD₆₀₀ de 1,0 ou do OD₆₀₀ de 0,1 foi adicionado em pequenos tubos de vidro e as colunas de microareia imersas nas misturas do meio/ células com a boca estreita das pipetas Pasteur apontadas para cima. Os frascos externos foram selados na câmara anaeróbica e deixados para incubar à temperatura ambiente por 24 horas. A Tabela 5 mostra as cepas testadas e as observações da liberação do petróleo após 24 horas.

TABELA 5**LIBERAÇÃO DO PETRÓLEO DAS COLUNAS DE MICROAREIA POR CEPAS BACTERIANAS****ISOLADAS**

Isolado bacteriano	Inóculo	Inóculo
	OD ₆₀₀ =1	OD ₆₀₀ =0,1
<i>Petrotoga mioterna</i>	pouca liberação	sem liberação
<i>Marinobacterium georgiense</i>	sem liberação	sem liberação
<i>Fusibacter paucivorans</i>	liberação de petróleo	sem liberação
<i>Thauera aromatica T1</i>	pouca liberação	sem liberação

Dos isolados selecionados neste exemplo, 3 gêneros diferentes demonstraram diferentes níveis de liberação do petróleo. No OD₆₀₀ = 1, o maior nível de liberação do petróleo foi observado com o *Fusibacter paucivorans* enquanto o *Thauera aromatica* mostrou a maior liberação de petróleo nas concentrações celulares de OD₆₀₀ = 0,1. Embora a *Marinobacterium georgiense*

tenha a capacidade de crescer bem no petróleo como única fonte de carbono, ela não liberou o petróleo nessas condições experimentais. Essa observação pode ser racionalizada pela sensibilidade da liberação do óleo por esta cepa aos fatores tais como o estágio de crescimento e/ou os requisitos de meio específico. Estas experiências demonstraram que cepas selecionadas através de análises filogenéticas podem ser eficazes no crescimento no petróleo em condições anaeróbicas desnitrificantes e na liberação do petróleo no teste de liberação de areia/ petróleo descrito no presente.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> E.I. du Pont de Nemours and Company

<120> MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO A PARTIR DE UM
RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO

<130> CL3965

<140> CL3965

<141> 2007-08-22

<150> US60/957,805

<151> 24/08/2007

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 1

agagtttgat ymtggctcag

20

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 2

gacgggggtg wgtrcaa

17

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO A PARTIR DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) fornecer uma amostra ambiental que compreende uma população microbiana autóctone;

(b) identificar o gênero microbiano presente em dita amostra ambiental por tipagem filogenética;

10 (c) selecionar uma ou mais espécies de cultura pura conhecidas do gênero identificado em (b), em que ditas espécies são capazes de crescer no petróleo; e

(d) identificar as funcionalidades relevantes das espécies de (c) para uso na melhoria da recuperação do petróleo.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
15 pelo fato de que as funcionalidades relevantes de (d) são selecionadas a partir do grupo que consiste em: capacidade de reduzir nitritos e nitratos e crescer em condições anaeróbias; capacidade de utilizar pelo menos um componente disponível no poço de petróleo como fonte de carbono; capacidade de utilizar
20 pelo menos um componente na água injetada ou produzida; capacidade de atingir uma taxa de crescimento desejada na presença do petróleo; e capacidade de crescer de forma ótima em um ambiente de poço de petróleo, e suas combinações.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo fato de que compreende adicionalmente inocular dito poço de petróleo
25 com uma ou mais espécies conhecidas que podem ou não possuir interações sintróficas, que possuem dita funcionalidade relevante identificada em (d), para melhorar a recuperação do petróleo.

4. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3,

caracterizado pelo fato de que as funcionalidades relevantes fornecem uma melhor recuperação do petróleo pela alteração da permeabilidade da formação subterrânea para melhorar a eficiência da varredura de água, produção de biotensoativos para diminuir as tensões superficiais e interfaciais, alteração na molhabilidade, produção de polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo, produção de ácidos de baixo peso molecular que causam dissolução das rochas, e geração de gases (principalmente o CO₂), para aumentar a pressão de formação e reduzir a viscosidade do petróleo para facilitar a recuperação e o processamento do petróleo bruto pesado.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a melhor recuperação do petróleo ocorre através da redução na viscosidade do petróleo bruto pelo crescimento de uma espécie de (d), em que dito crescimento resulta na produção de qualquer um dos biotensoativos, dióxido de carbono ou massa celular, degradação seletiva dos componentes de alto peso molecular no poço de petróleo ou suas combinações.

6. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que dita melhoria na recuperação de petróleo ocorre pelo crescimento de uma espécie de (d) em um poço de petróleo, em condições anaeróbias e desnitrificantes, substancialmente sem corrosão da maquinaria de recuperação e processamento.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de modificar o ambiente do poço de petróleo pela adição de nitritos simples ou nitratos simples ao poço de petróleo para promover o crescimento de micróbios no poço de petróleo para melhorar a recuperação do petróleo sem fontes de carbono adicionais.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os gêneros da etapa (b) são identificados pelo uso de *primers* que compreendem as regiões conservadas de rDNA.

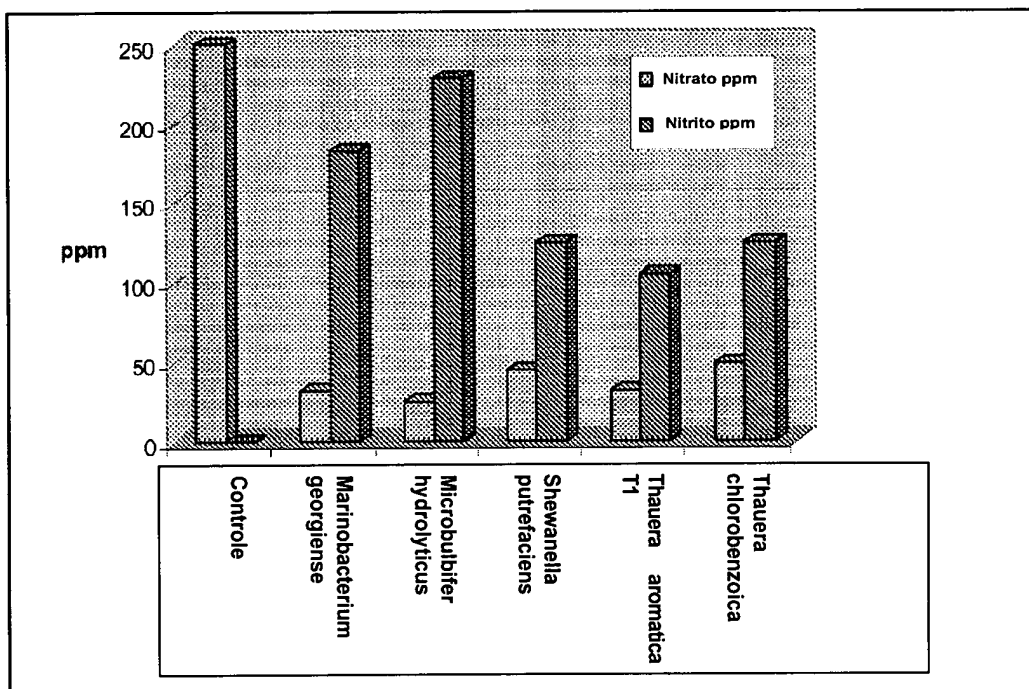
9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os gêneros microbianos são identificados utilizando sondas moleculares que possuem a SEQ ID NO: 1 e a SEQ ID NO: 2.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os gêneros microbianos identificados na etapa (b) são selecionados a partir do grupo que consiste em: *Chloroflexi*, *Petratoga*, *Arcobacter*, *Agrobacterium*, *Acetobacterium*, *Shewanella*, *Spirochaeta*, *Alkalibacter*, *Actinobacter*, *Pelobacter*, *Clostridium*, *Desulfomicrobium*, *Vibrio*, *Marinobacterium*, *Pseudomonas* e *Fusibacter*.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que as espécies de cultura pura conhecidas são selecionadas a partir do grupo que consiste em *Fusibacter*, *Marinobacter*, *Petrotoga*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Thauera*, *Comamonas* e *Vibrio*.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a modificação do poço de petróleo para selecionar, de preferência, um gênero identificado na etapa (b) para não competir com um ou mais gêneros identificados em (b) para melhorar a recuperação do petróleo.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dito ambiente do poço de petróleo favorece os micróbios selecionados a partir do grupo que consiste em mesofílicos, termofílicos, halofílicos, acidofílicos, alcalifílicos, psicofílicos e piezófilos.

**Figura 1**

RESUMO**“MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DE PETRÓLEO A PARTIR
DE UM RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO”**

A presente invenção descreve um método de identificação
5 filogenético novo para a identificação de espécies de bactérias desnitrificantes
anaeróbias nativas em um poço de petróleo que são capazes de modificar as
propriedades do petróleo bruto para aumentar sua recuperação.