



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

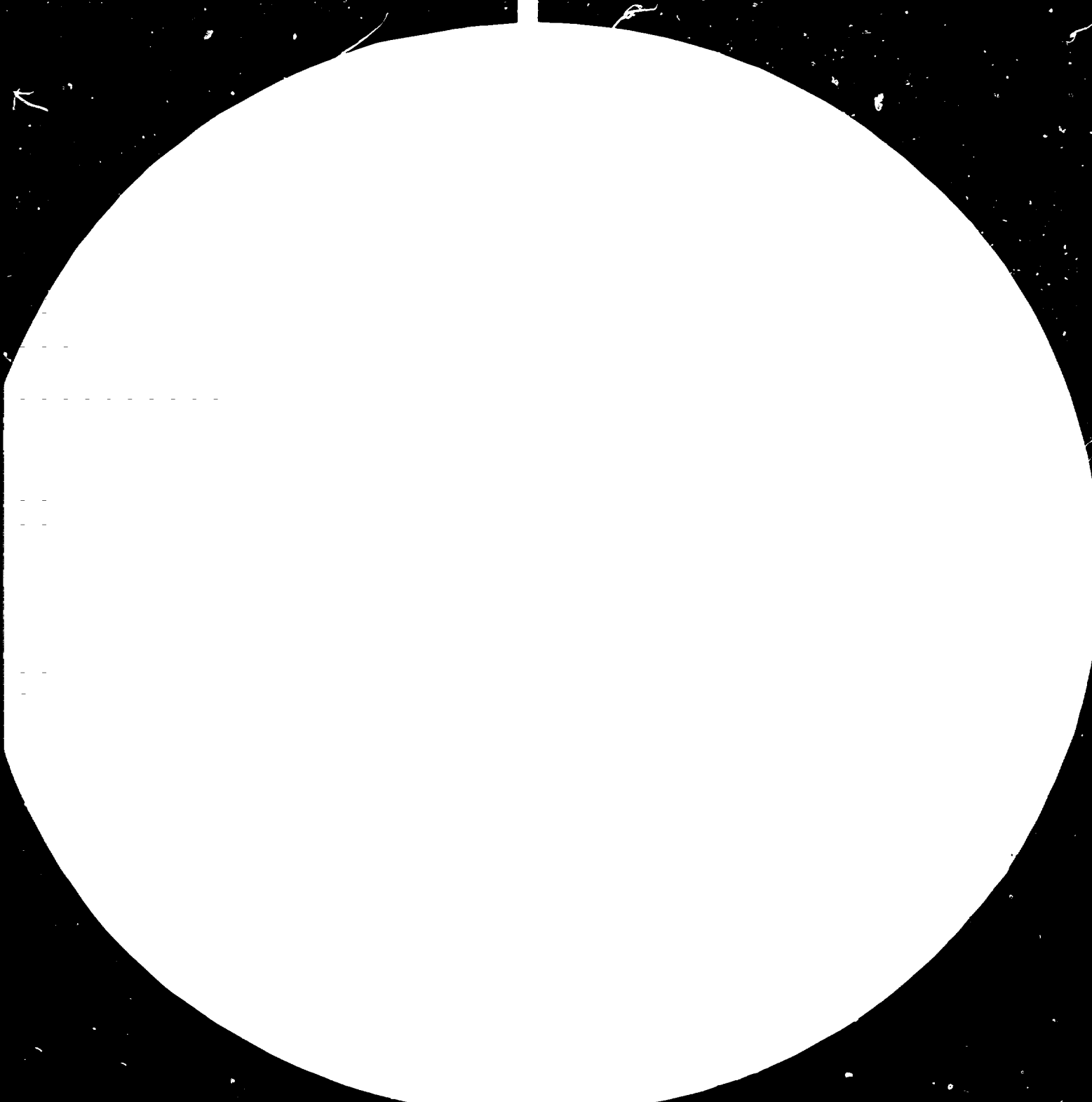
## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)





28



1.5



1.25 

1.4 

1.6 

Mr. Robert M. ...

...

...



11731-S



Distr. LIMITADA

ID/WG.382/2/Add.3  
20 septiembre 1982

ESPAÑOL  
Original: INGLES

Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial

Reunión de alto nivel sobre la creación  
del Centro Internacional de Ingeniería Genética  
y Biotecnología

Belgrado, Yugoslavia, 13-17 diciembre 1982

MACROBIOLOGIA DE HIDROCARBUROS, CON ESPECIAL REFERENCIA  
A LA RECUPERACION TERCIARIA DE LOS POZOS\*

preparado por  
Ananda Chakrabarty\*\*

\* Las opiniones que el autor expresa en este documento no reflejan necesariamente las de la secretaría de la ONUDI. El presente documento es traducción de un texto que no ha pasado por los servicios de edición de la ONUDI.

\*\* Profesor, Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois at the Medical Centre, 835 S. Wolcott Street, Chicago, Ill. 60680, Estados Unidos de América.

V.82-30503

INDICE

	<u>Página</u>
A. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	1
- Características de los microorganismos	3
- Ventajas y desventajas del sistema de extracción microbiana de petróleo	5
B. ACTIVIDADES	7
- Creación de cepas para la extracción de petróleo terciario	9
- Desparafinado y desulfurado del petróleo bruto	11
- Eliminación de residuos de petróleo	11
C. PLAN DE TRABAJO	12
D. COOPERACION CON OTRAS INSTITUCIONES	12
E. REQUISITOS PREVIOS	12
F. NECESIDADES FINANCIERAS	13
- Presupuesto quinquenal	14
ANEXO I	
NECESIDADES DE EQUIPO	15
REFERENCIAS	16

#### A. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Los microorganismos son bien conocidos por su capacidad para atacar a los hidrocarburos, tanto alifáticos como aromáticos, que se encuentran en el petróleo bruto (1.2). Los cultivos bacterianos puros o mixtos pueden producir cambios importantes en la composición del petróleo bruto, por la digestión total o parcial de los componentes hidrocarbúricos mediante un metabolismo completo o cooxidativo (3). Ese crecimiento microbiano produce normalmente un cambio en el pH del medio y una alteración de las propiedades fisicoquímicas del petróleo.

Se admite en general que la actual tecnología de extracción de petróleo permite extraer del 30 al 40% del petróleo de la mayoría de los pozos. La mayor parte del petróleo queda embebido en las rocas, a causa de su gran viscosidad. Según datos de 1976, se sabe que en los Estados Unidos de América hay  $27 \times 10^{10}$  barriles en total, de los cuales se han extraído  $6 \times 10^{10}$  utilizando métodos rudimentarios, y se están extrayendo  $3 \times 10^{10}$  barriles por procesos mejorados, mientras que los  $18 \times 10^{10}$  barriles restantes siguen en el subsuelo como aceite pesado.

La utilidad de los microorganismos para la extracción del petróleo secundario no puede exagerarse. En los Estados Unidos de América, hasta mediados del decenio de 1970, el precio del petróleo se ha regulado y mantenido a una tasa apreciablemente inferior a la de la mayoría de las restantes partes del mundo. No había incentivo económico para obtener más petróleo que el que podía extraerse fácilmente por los medios técnicos disponibles. Desde entonces, se ha producido una continua escasez de petróleo en todo el mundo, traducida en un aumento drástico de los precios. A causa de la escasez de petróleo, el precio del petróleo secundario ha sido recientemente liberalizado y se ha hecho evidente la necesidad de aumentar la producción de petróleo bruto.

Aunque los medios microbiológicos de extraer el petróleo secundario no han recibido seria atención en los Estados Unidos de América, algunos de los principios de esa tecnología se desarrollaron indudablemente en ese país entre el decenio de 1940 y el de 1960 (4.56). En cambio, la extracción microbiana del petróleo secundario ha sido objeto de ensayos sobre el terreno en los países de la Europa oriental, en particular en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), Hungría, Polonia y Checoslovaquia. Así, trabajadores soviéticos (7) han informado sobre la liberación con éxito del petróleo de

depósitos que contenían petróleo muy viscoso, con una permeabilidad de 1.000 md., mediante la inyección de cultivos mixtos de cepas bacterianas. Ensayos importantes sobre el terreno realizados en Hungría han demostrado la aplicabilidad de la extracción microbiana del petróleo bruto (8). En un ensayo típico, se inyectaron en un pozo 20 metros cúbicos de una mezcla compuesta de 120 m<sup>3</sup> de agua de pozo, 40 toneladas de melazas, 120 kg de KNO<sub>3</sub> y 100 kg de azúcar, juntamente con 100 litros de un cultivo bacteriano mixto que contenía Pseudomonas, Clostridium y Desulfovibrio (9). Se cerró el pozo durante tres meses, al término de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados (cuadro 1).

Cuadro 1

Cambios en la composición del depósito  
después de inyectar  
microorganismos en  
un pozo de  
petróleo

Parámetros medidos	Condiciones	
	en el pozo original	después de 3 meses de incubación
Producción de petróleo	no especificada	superior en un 60% a la original
Viscosidad del petróleo	42 centistokes	18 cSt a 40° C
CO <sub>2</sub> gaseoso	0	40 m <sup>3</sup> /día
CO <sub>2</sub> disuelto	0	370 mg/litro
pH del agua del depósito	9	6

En otros ensayos sobre el terreno se observó una reducción similar de la viscosidad del petróleo, así como del pH del agua del depósito. En otro experimento típico sobre el terreno, Karaskiewicz (10) ha informado sobre cambios de la viscosidad, desde 10,67 centistokes hasta 4,37 cSt, con una disminución simultánea de la gravedad específica desde 0,8516 hasta 0,8320. Se cree que microorganismos capaces de digerir las fracciones pesadas del petróleo bruto, produciendo fracciones ligeras y gases, son las causantes de esa reducción de la viscosidad (11).

Karaskiewicz ha informado sobre importantes ensayos sobre al terreno realizados en Polonia (10). En un ensayo típico, un pozo de la región de los Cárpatos produjo mensualmente 4.460 kg de petróleo, 16.610 kg de agua y



3.780 m<sup>3</sup> de gas. La porosidad de la roca del depósito era del 13% y la permeabilidad de 120 md. Se inyectaron en el pozo cultivos bacterianos mixtos y nutrientes, y se cerró durante tres meses. Al terminar este período, la producción de petróleo aumentó en un 360% y esa producción aumentada (superior en un 260% al promedio) continuó durante seis meses antes de descender a su nivel anterior. El pH del agua del depósito disminuyó desde 8,7 hasta 6,7 en ese período.

Los ensayos sobre el terreno de extracción microbiana del petróleo realizados en los Estados Unidos han sido escasos (6), pero un informe (12) señala que cabe esperar un aumento medio de la producción de petróleo superior al 350%, a un costo que varía entre 15 y 50 centavos por barril adicional de petróleo. Además, recientes investigaciones de la Petrogen Inc. (comunicación personal del Dr. A. T. Swan, Director de Investigaciones de la Petrogen), durante un reciente ensayo de 100 días realizado hacia finales de 1981 en cuatro pozos de petróleo de escasa producción, tratados con microorganismos especialmente adaptados (Biopackage I), indicaron una extracción de petróleo por valor de unos 24.800 dólares. Inmediatamente antes de su tratamiento con el Biopackage I, los cuatro pozos de petróleo producían petróleo bruto por valor de unos 4.132 dólares durante el período de ensayo de 100 días. Así pues, el tratamiento microbiano de los pozos de petróleo se ha traducido en este caso particular, según se informa, en un aumento séxtuple del petróleo extraído.

#### Características de los microorganismos

Los experimentos sobre el terreno parecen demostrar la viabilidad práctica de la extracción microbiana de petróleo secundario de pozos de petróleo abandonados. Debe subrayarse que el aumento de la producción de petróleo debido a la inyección de cultivos microbianos ha sido probablemente mínimo, ya que no se tomaron precauciones especiales para utilizar microorganismos específicamente destinados a ese fin. Al parecer, en casi todos los casos el aumento de la producción de petróleo se debió básicamente a dos razones:

- a) producción de grandes cantidades de CO<sub>2</sub> debida al metabolismo bacteriano en el depósito. Como el CO<sub>2</sub> es particularmente miscible con el petróleo, éste se dilata y se hace menos viscoso; y
- b) producción de grandes cantidades de ácido acético, ácido propiónico y otros ácidos orgánicos que reaccionan con los carbonatos alcalinos del depósito, en la formación causando un aumento de la porosidad de las rocas y la producción de más CO<sub>2</sub>. El exceso de CO<sub>2</sub> y de otros gases ejerce también presión para obligar al petróleo a salir de las bolsas de arena y roca.

Los éxitos registrados en la extracción microbiana de petróleo secundario, aunque esporádicos, y el continuo aumento del precio del petróleo (que es en la actualidad de unos 34 dólares el barril) han despertado un interés considerable por explorar esta tecnología como medio viable de aumentar la producción de petróleo, habida cuenta especialmente de que el petróleo secundario así producido no estará sometido a regulación y obtendrá un precio con prima. En un simposio organizado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos (13) se llegó al consenso de que la extracción microbiana de petróleo es una meta técnicamente alcanzable y de que el proceso podrá perfeccionarse probablemente de modo considerable si los microorganismos presentan algunas características convenientes. Se han estimado como particularmente convenientes las siguientes:

a) Producción de ácidos

Además de producir  $\text{CO}_2$  mediante su metabolismo, los microorganismos deberían ser capaces también de producir ácidos in situ. Esos ácidos pueden ayudar entonces a disolver las estructuras de las rocas carbonatadas, aumentando la porosidad de las rocas para facilitar la migración del petróleo y permitiendo asimismo la liberación de más  $\text{CO}_2$  para hacer salir al petróleo de las rocas embebidas. Los ácidos deberían ser ácidos minerales fuertes como el  $\text{HCl}$  o el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , o ácidos orgánicos como el acético, el propiónico, el succínico, etc.

b) Producción de biopolímeros o de agentes superficiaoctivos

Los biopolímeros y los agentes superficiaoctivos se utilizan corrientemente en el agua de inundación para disminuir la tensión superficial en la zona de contacto entre el petróleo y el agua. Idealmente, deberían producirse in situ mediante microorganismos, garantizando un suministro continuo de esos materiales en las zonas de difícil acceso de las rocas embebidas de petróleo. Esto elimina también el problema del transporte, almacenamiento y entrega de esos materiales durante la inundación con agua.

c) Consumo de los componentes de alta viscosidad del petróleo

La menor movilidad del petróleo secundario se debe primordialmente a su alta viscosidad. Si los microorganismos pueden eliminar selectivamente los componentes parafínicos y otros componentes de alta viscosidad del petróleo, produciendo una disminución de esa

viscosidad, el petróleo podrá extraerse fácilmente mediante inundación con agua y bombeo. Por añadidura, toda pérdida de componentes con azufre en esa fase se traducirá en la extracción de petróleo bruto con escaso contenido de azufre, que normalmente obtendrá un precio con prima.

d) Crecimiento y tolerancia

Los microorganismos que se consideran apropiados para su utilización en la extracción de petróleo secundario deberán poder crecer a temperaturas muy diversas (de 35° C a 45° C o más), tener necesidades nutricionales simples y, preferiblemente, capacidad para utilizar sustratos poco costosos (o componentes muy viscosos del propio petróleo, o ambos como única fuente de carbono, y utilizar nitratos o fijar el N<sub>2</sub> para obtener su fuente de nitrógeno celular. Deberían ser no patógenos, ecológicamente compatibles, fáciles de producir en el laboratorio en grandes cantidades y fáciles de seguir mediante la incorporación de un marcador genético visible de alguna propiedad única relacionada con el crecimiento.

Ventajas y desventajas del sistema de extracción microbiana de petróleo:

- a) La principal ventaja de un sistema microbiano es que es poco costoso y sencillo. La inyección de unos centenares de galones de cultivos mixtos y de mezcla de nutrientes en un pozo es relativamente simple y directa;
- b) La tecnología para la extracción del petróleo es bien conocida y la elaboración no entraña ninguna innovación técnica importante;
- c) El proceso puede ser a largo plazo, ya que las bacterias digieren continuamente las fracciones de petróleo muy viscosas, liberando ácidos y fracciones ligeras. Los ácidos pueden reaccionar continuamente con las rocas produciendo más CO<sub>2</sub> y aumentando la porosidad de éstas, que liberarán así más petróleo.

La principal desventaja del proceso es la existencia de un medio ambiente riguroso en la mayoría de los pozos de petróleo, que no favorece un crecimiento microbiano sostenido. Son especialmente importantes los siguientes aspectos:

- a) Temperatura: la mayoría de los pozos de petróleo que han sido altamente productivos son muy profundos y la temperatura puede variar en general, entre 70 y 95° C. Por ello, los microorganismos mesofílicos y moderadamente termofílicos no podrán proliferar en esas condiciones.

- b) Presión: aunque la presión no es normalmente un factor, la presión más elevada en algunos pozos de petróleo (50 atm) puede reducir la actividad biológica en un medio ambiente por lo demás desfavorable.
- c) Naturaleza de la arena y de las rocas: aunque las rocas carbonatadas pueden ser corroídas gradualmente por los ácidos producidos microbiana-mente, las rocas silicatadas pueden ser muy resistentes en esas condiciones.

Por consiguiente, parecería que la extracción microbiana del petróleo, por lo menos inicialmente, deberá limitarse a los pozos poco profundos con estructuras de rocas carbonatadas predominantemente alcalinas. Si el proceso permite aumentar la producción de petróleo, se podrán crear bacterias termofílicas con características convenientes, considerando las de los pozos de petróleo de que se trate. Teniendo en cuenta la gran cantidad de petróleo atrapado en las rocas, la escasez y el precio en espiral del petróleo bruto, y la naturaleza poco costosa del proceso, resulta imperativo ensayar el proceso de extracción microbiana del petróleo en cierto número de pozos, a fin de ensayar su eficacia.

El principal objetivo del programa es mejorar la extracción del petróleo de los pozos ya excavados y de los que se ha bombeado el petróleo en su mayor parte. Por consiguiente, este programa queda comprendido en la categoría de la extracción secundaria y terciaria del petróleo. Teniendo en cuenta el hecho de que hay innumerables pozos de petróleo en diversos países en desarrollo que producen menos de un barril diario, un aumento de la producción de petróleo mediante la tecnología microbiana ayudaría a paliar algunos de los problemas energéticos de esos países. Otro objetivo es facilitar el almacenamiento y transporte de petróleo bruto, desarrollando bacterias genéticamente estructuradas que sean capaces de utilizar los componentes parafínicos del petróleo bruto, reduciendo así grandemente su viscosidad. Ese petróleo fluido de poca viscosidad no sólo obtendrá un precio con prima sino que tendrá menos tendencia a formar una masa sólida durante el transporte en los meses de invierno, lo que aumenta grandemente el costo del bombeo. El petróleo fluido es también mucho más fácil de almacenar en cuevas subterráneas que el de gran viscosidad. Otro objetivo más es desarrollar microorganismos que sean capaces de utilizar los compuestos que contienen azufre común presentes en el petróleo bruto. Por consiguiente, podrá lograrse la desulfurización del petróleo bruto mediante la utilización de esos microorganismos. Juntamente con esos compuestos orgánicos que contienen azufre, muchas variedades de petróleo bruto contienen también rastros de metales como vanadio, níquel,

molibdeno, etc. que disminuyen la calidad del petróleo. Se desarrollarán igualmente microorganismos capaces de eliminar de forma selectiva esos metales. Por último, podrán combatirse los vertidos de petróleo, ya sea mediante el lavado deliberado del petróleo residual de los buques petroleros o la eliminación del debido al abordaje o varada accidentales de esos buques, mediante la aplicación de microorganismos genéticamente creados o la utilización de agentes emulsionantes producidos bacterianamente. Esos agentes emulsionantes podrán utilizarse también ampliamente para eliminar el petróleo residual y los residuos de petróleo en tambores, coches o camiones cisterna y buques petroleros. Los ensayos sobre el terreno de esos microorganismos o agentes emulsionantes se harían con muestras de petróleo tomadas de pozos de diversos países en desarrollo.

#### B. ACTIVIDADES

Como el programa de extracción de petróleo se ocuparía de otros aspectos, además del de la extracción terciaria -por ejemplo, desparafinado y desulfurado del petróleo, limpieza de residuos de petróleo y eliminación de metales-, es evidente que estarían asociadas al programa diversas clases de actividades. El principal componente sería el de investigación y desarrollo, en el que se realizarían investigaciones en todas las esferas mencionadas bajo la dirección de un jefe de grupo asociado al CIIGB. Unos tres jefes de grupo, cada uno de ellos con un becario posdoctoral y un técnico, trabajarán en los cinco proyectos. Se prevé que cinco alumnos de países en desarrollo, preferentemente de países productores de petróleo, recibirán formación en todas las esferas de investigación mencionadas, es decir, uno en desparafinado, uno en desulfurado y uno en eliminación de iones metálicos, y dos en el desarrollo de cultivos aerobios y anaerobios capaces de liberar el petróleo de pozos abandonados. En los países ricos en esquistos bituminosos o arenas impregnadas de brea (como el Canadá), podrán iniciarse también algunas actividades de investigación en esta esfera. Este grupo organizará anualmente cursos prácticos, en colaboración con los grupos de microbiología del petróleo de otros institutos de países en desarrollo y desarrollados, sobre temas como la función de los microorganismos en la degradación de los hidrocarburos existentes en el petróleo bruto y vertido, factores limitativos (por ejemplo, la naturaleza del petróleo, el pH, la temperatura, la tensión del  $O_2$ , etc.) de esa biodegradación, métodos para estimular la biodegradación natural, mejoramientos genéticos de la biodegradación de hidrocarburos de cadenas de diversas longitudes, etc. Además, el

grupo estaría dirigido por un comité asesor compuesto de expertos en genética, microbiólogos, ecólogos, geólogos e ingenieros del petróleo para asesorar sobre las aplicaciones de cualquier microorganismo creado en un medio abierto, ya sea para limpiar residuos de petróleo, desparafinar y desulfurar, o bien para utilizar esos microorganismos en los pozos de petróleo a fin de aumentar la liberación de éste.

En el CIIGB se necesitarán amplias instalaciones de planta experimental para realizar con éxito ensayos sobre el terreno. Se confía en contar para ello con instalaciones centralizadas; de otro modo, harán falta varios fermentadores con capacidades de 10 a 1.000 galones. Deberían contratarse con ese fin uno o más técnicos, expertos en el manejo de fermentadores y la recolección de células. A falta de unas instalaciones centralizadas, se necesitará una zona de 2.000 pies cuadrados más para albergar las instalaciones de fermentación. El costo de los fermentadores será de unos 100.000 dólares.

Para los verdaderos ensayos sobre el terreno, habrá que transportar cerca del emplazamiento del pozo de petróleo los microorganismos cultivados en el fermentador, juntamente con los nutrientes, y bombear esos microorganismos, en unión de los nutrientes, en el pozo de petróleo. Para esta operación se necesitará un par de camiones dotados de equipo de bombeo. Se confía en que serían facilitados por los empresarios o propietarios de los pozos de petróleo de que se tratara.

El principal resultado del programa sería la creación de cepas genéticamente estructuradas, capaces de desparafinar y desulfurar el petróleo bruto, utilizar rápidamente el petróleo vertido, eliminar de ese petróleo algunos metales inconvenientes y, finalmente, liberar el petróleo de gran viscosidad embebido en las rocas que no puede ser extraído normalmente por bombeo utilizando la tecnología actual. Es posible que algunos de esos objetivos no se alcancen en los cinco años de duración del programa. Aunque se puedan crear cepas genéticamente estructuradas, habrá que ensayar la eficacia de esas cepas en un medio abierto. Recientemente se ha demostrado que otra cepa genéticamente estructurada capaz de digerir un producto químico tóxico persistente como el 2,4,5-T era muy eficaz para eliminar ese contaminante del medio ambiente (14). En este sentido, se espera que las cepas creadas para la liberación de petróleo o el desparafinado y desulfurado del petróleo bruto sean eficaces en sus respectivas esferas de aplicación.

### Creación de cepas para la extracción de petróleo terciario

Muchos de los parámetros de la extracción mejorada del petróleo por medios microbianos han sido evaluados recientemente en una serie de estudios patrocinados por el Departamento de Energía de los Estados Unidos, y una de las conclusiones importantes obtenidas es que alrededor del 30 al 40% de los pozos de petróleo de Oklahoma, Texas, Louisiana, Kansas, etc. resultan apropiados para la utilización de procesos microbianos de extracción mejorada del petróleo, si se pueden obtener microbios y procesos adecuados (véase el informe sobre el contrato No. DE-AC10-80BC10169 del Departamento de Energía de los Estados Unidos, 1981). Suponiendo que el CIIGB pueda desarrollar esos microorganismos y que éstos sean capaces de permitir una extracción del 10 al 20% del petróleo residual, puede preverse fácilmente el enorme impacto que tendrá esa tecnología en la disponibilidad de petróleo bruto en todo el mundo.

Al crear microorganismos apropiados, habría dos métodos de investigación fundamentales que el CIIGB debería seguir. Uno sería el adoptado por el Departamento de Energía de los Estados Unidos, consistente en aislar cultivos termofílicos, halotolerantes y anaerobios, ya sea procedentes de plantas de tratamiento de desechos o de núcleos de depósitos de pozos de petróleo. Entonces podrían intentarse mejoramientos mutacionales u otros mejoramientos genéticos para aumentar el rendimiento de los cultivos en relación con su tolerancia a condiciones extremas de pH, salinidad, presión, temperatura, etc., y mejorar su capacidad para transformar materiales parafínicos en petróleo líquido (véanse los informes sobre los contratos DE-AT19-78BC30201, DE-AS19-80BC10302, DE-AS19-81BC10507, DE-AC19-80BC0300, etc. del Departamento de Energía de los Estados Unidos).

Debe subrayarse que los anaerobios no resultan particularmente apropiados para programas óptimos de liberación de petróleo. No se tiene noticia de que puedan biodegradar los hidrocarburos a un ritmo apreciable, por lo que, para su proliferación, deben suministrarse al pozo de petróleo fuentes de carbono fácilmente asimilable. En segundo lugar, los estudios genéticos con anaerobios se encuentran en sus comienzos, de forma que no sería ajustado a la realidad pensar en lograr mejoramientos genéticos apreciables en estos momentos. No obstante, recientes experimentos con cultivos anaerobios realizados en varios pozos de petróleo de Texas y Oklahoma por una empresa llamada Petrogen Inc. han demostrado que, de 24 pozos de petróleo inyectados

en seis formaciones diferentes a profundidades que oscilan entre 300 y 4.600 pies con cultivos anaerobios especialmente aclimatados, cuatro indicaron una duplicación de los niveles de producción anteriores a la inyección, en un período de seis meses, mientras otros 12 mostraban aumentos del 50% con respecto a los niveles de producción anteriores a la inyección, en un período de tres meses (Dr. A.G. Swan, Director de Investigaciones, Petrogen Inc., comunicaciones personales).

El segundo método del programa de extracción mejorada del petróleo por medios microbianos que emprendería el CIIGB consistiría en manipular genéticamente cultivos aerobios, en particular del tipo Pseudomonas, con ese fin. Las bacterias pertenecientes al género Pseudomonas son bien conocidas por su capacidad para utilizar hidrocarburos, incluido el C20 y otros tipos parafínicos. Crecen rápidamente a temperaturas de hasta 44°C, y toleran altas presiones, cantidades apreciables de salinidad (la especie marina Pseudomonas tolera incluso una salinidad elevada), variaciones del pH, etc. Las especies de Pseudomonas son conocidas también por producir biopolímeros polisacáridos y pueden liberar grandes cantidades de ácidos fuertes como el HCl procedente de compuestos clorados. Los instrumentos genéticos para mejorar las especies de Pseudomonas están bastante avanzados. El único inconveniente para la utilización de esas especies es que tales bacterias son anaerobias, aunque algunas especies pueden crecer muy bien en condiciones anaerobias, con nitratos como aceptores de electrones. Además de utilizar nitratos, es posible emplear las técnicas del ADN recombinado para introducir genes extraños en las especies de Pseudomonas, que les permitan producir oxígeno in situ en los pozos. Así, la creación de una bacteria Pseudomonas capaz de digerir los materiales parafínicos muy viscosos de los pozos de petróleo, produciendo polímeros polisacáridos y HCl a partir de compuestos clorados, y de proliferar en un medio anaerobio con la producción in situ de oxígeno, es algo que puede lograrse en el CIIGB. La creación de esas cepas especializadas y un estudio de su eficacia para la extracción mejorada de petróleo de los pozos abandonados será, por consiguiente, una parte importante de los proyectos del programa general del CIIGB. El inyectar aire en los pozos de petróleo y permitir a las cepas de Pseudomonas genéticamente manipuladas que proliferen para liberar petróleo será también parte de los ensayos sobre el terreno del CIIGB.



### Desparafinado y desulfurado del petróleo bruto

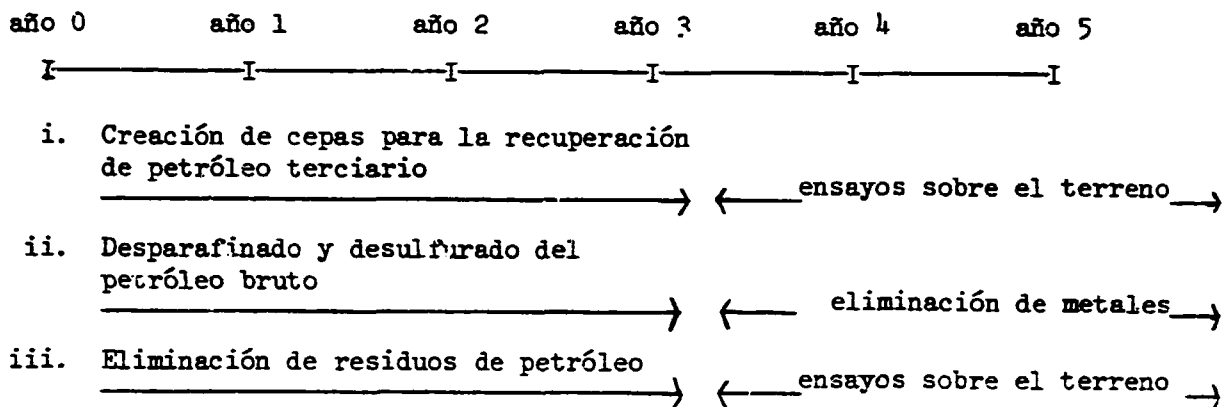
Los recientes estudios genéticos realizados con las especies de Pseudomonas han demostrado que es posible cultivar especialmente en el laboratorio cepas que puedan utilizar un compuesto conocido y persistente como el herbicida 2,4,5-T (15). Como no hay microorganismos en la naturaleza que puedan utilizar el 2,4,5-T como única fuente de carbono, el cultivo de esas cepas en el laboratorio permite esperar que puedan crearse otras cepas análogas capaces de utilizar otros compuestos recalcitrantes como los dibenzotiofenos o furanes que, según se sabe, se encuentran en el petróleo bruto. La posibilidad de utilizar cultivos bacterianos capaces de disimilar los dibenzotiofenos convirtiéndolos en un producto soluble en el agua, al eliminar el 90% del azufre del petróleo bruto ha sido demostrada ahora. Como la presencia de compuestos de parafina o azufre en el petróleo bruto produce problemas de transporte y contaminación, el desarrollo de cultivos capaces de desparafinar o desulfurar el petróleo bruto sería muy útil. Además, como se dice en la sección sobre extracción mejorada, la introducción de esas características en las cepas que se utilizarían para la extracción mejorada no sólo liberaría el petróleo de los pozos de escasa producción sino que ese petróleo obtendría un precio con prima, a causa de su desparafinado y desulfurado in situ. Tales microorganismos resultarían especialmente útiles para el petróleo bruto extraído en la República Popular de China, Indonesia, Nigeria, Venezuela, etc. También se intentará la eliminación de algunos de los metales presentes en el petróleo bruto de algunos países mediante la utilización de bacterias genéticamente manipuladas.

### Eliminación de residuos de petróleo

Otro proyecto que debería interesar al CIIGB es la creación de cepas multiplasmídicas capaces de utilizar rápidamente el petróleo vertido. Aunque la patente general para la creación de esas cepas y su utilización en la zona de vertido es propiedad de la General Electric Company, pueden hacerse muchos otros mejoramientos en las cepas. Se han descrito con detalle la creación y la manipulación genética de esas cepas (16). El CIIGB podría adoptar métodos análogos para crear una cepa más eficiente. La utilidad de esa cepa para eliminar el petróleo vertido se ensayaría en diversas zonas, como lagos y ríos de agua potable, mares ribereños y distantes, etc., a fin de determinar su eficiencia. En caso necesario, se crearían cepas distintas,

en función de la naturaleza del petróleo vertido, el estado ecológico de la masa de agua (por ejemplo, lagos de agua dulce o mares), etc.

### C. PLAN DE TRABAJO



### D. COOPERACION CON OTRAS INSTITUCIONES

La cooperación con institutos del petróleo y otras instituciones competentes se logrará mediante la ejecución del programa.

La cooperación con los institutos y organismos nacionales para realizar ensayos sobre el terreno eficaces será un componente importante del programa de trabajo.

### E. REQUISITOS PREVIOS

Un requisito previo importante del programa son las calificaciones académicas apropiadas de los alumnos procedentes de países en desarrollo. Esos alumnos deberán tener una formación muy sólida en fisiología microbiana y genética, y conocimientos considerables de las técnicas analíticas. En la selección preliminar de los alumnos se debería tener en cuenta también el tipo de institución a la que regresarán los alumnos, es decir, si trabajarán en un instituto de investigaciones sobre el petróleo o en una institución médica o departamento universitario de ciencias biológicas; la posibilidad de que el alumno utilice sus conocimientos especializados para realizar investigaciones en materia de extracción microbiana del petróleo o de eliminación del petróleo vertido en las aguas será mucho mayor en el caso del instituto de investigaciones que en los otros dos. La misma lógica se aplica para preferir los alumnos procedentes de países productores de petróleo a los procedentes de países sin petróleo, en la medida en que aquéllos

tendrán abundantes oportunidades de aplicar sus conocimientos especializados, que no tendrán los procedentes de los países últimamente citados.

El costo de los ensayos sobre el terreno podría repartirse entre el CIIGB y los empresarios de pozos de petróleo, en particular si se comprueba que los microorganismos desarrollados son eficaces para aumentar varias veces la extracción del petróleo. Como el cultivo de los microorganismos o el suministro de nutrientes no son partidas costosas, el costo de cada inyección en un pozo de petróleo no debería ser superior a 5.000 dólares. En algunos casos, ese costo podrá compensarse con las ganancias del petróleo extraído. En general, el costo total de los ensayos sobre el terreno no debería exceder de 100.000 dólares anuales.

#### F. NECESIDADES FINANCIERAS

Para ejecutar este programa de trabajo se necesitaría el siguiente personal:

- dos científicos de categoría superior
- cuatro científicos de categoría subalterna
- tres becarios posdoctorales
- cuatro técnicos

Se espera que participen en el desarrollo del programa 15 alumnos.

Presupuesto quinquenal

PERSONAL (miles de dólares de los EE.UU.)

(primer año, al 40%; segundo año, al 60% del pleno funcionamiento)

Científico de categoría superior	8 años-hombre	600
Científico de categoría subalterna	16 años-hombre	720
Científico posdoctoral	12 años-hombre	288
Técnicos	16 años-hombre	<u>272</u>
Total parcial		1.880
Dirección del Centro y personal de apoyo		<u>489</u>
Total del personal		2.369

ACTIVIDADES OPERACIONALES

Científicos visitantes	20 meses-hombre	160
Reuniones de grupos de expertos	2 meses-hombre	50
Servicios de asesoramiento	15 meses-hombre	150
Capacitación	30 años-hombre	675
Material de información		15
Adquisición de productos químicos, etc.	56 años-unidad hombre	560
Asociaciones		75
Gastos diversos		<u>72</u>
Total de las actividades oper		1.757
Total del programa de trabajo		4.126

## ANEXO I

### NECESIDADES DE EQUIPO

Como se ha dicho supra, este programa requeriría la participación de dos a cuatro funcionarios del CIIGB y de cinco o seis alumnos procedentes de países en desarrollo. Ese personal no incluye el necesario para realizar los ensayos sobre el terreno. Como éstos se realizarán en colaboración con los empresarios de pozos de petróleo y su personal de ingeniería, la necesidad de contar con personal de esta clase en el CIIGB no es evidente.

Las necesidades de espacio para este programa serían de unos 5.000 pies cuadrados de laboratorio con bancos de trabajo, campanas químicas y sistemas de recipientes biológicos. Sería aconsejable separar la parte del laboratorio dedicada a manipulación genética de la de fisiología microbiana, para evitar problemas de contaminación excesivos. El laboratorio debería estar dotado de equipo moderno de preparación y análisis, como por ejemplo:

- ultracentrifugadoras (Beckman L8 o DuPont OTD65)
- espectrofotómetros registradores (por ejemplo, Gilford 2600 o Beckman 35)
- cromatógrafo de gases (Varian 3700)
- cromatografía líquida de alta presión (Perkin Elmer, serie 2)
- espectómetros de escintilación de líquidos (Packard Tri Carb o Beckman L57000)
- oxígrafos Gilson y respirómetros diferenciales
- electroforesis y densitómetros CCL
- liofilizadores
- células de presión francesas y sonicadores
- batidoras e incubadoras

Además, el grupo de investigación deberá tener acceso a microscopios electrónicos, cromatografía de gases-espectrometría de masas combinada y equipos de análisis infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y de resonancia de espines electrónicos. El costo de esos equipos podría ascender a 200.000 dólares.

REFERENCIAS

1. Gutnick, D.L. and Rosenberg, E., 1977, Ann. Rev. Microbiol. 31, 379 a 396.
2. Abbott, B.J. y Gledhill, W.E., 1971, Adv. Appl. Microbiol. 14, 249 a 388.
3. Perry, J.J., 1979, Microbiol. Rev. 43, 59 a 72.
4. ZoBell, C.E., 1946, U.S. Patent 2,413,278.
5. Bond, D.C., 1961, U.S. Patent 2,975,835.
6. Frick, J.R., 1972, J.Petrol Technol. 24, 1.469 a 1.470.
7. Senjukov, B.M., Yulbarson, V.M., Talbukina, E.H. y Sinsenina, E.P., 1970, Mikrobiológia 39, 705 a 710.
8. Jaranyi, I., Kiss, L., Szalanczy, G. y Szolnoki, J., 1965, Vorträge III. Inter. Wiss. Konferenz Geochem. Microbiol, 2, 633 a 650.
9. Jaranyi, I., Kiss, L. y Szalanczy, G., 1967, Magyar All. Foldtari Int. Jelentese 1967, 345 a 349.
10. Karaskiewicz, J., 1973, Nafta I, 144 a 151.
11. Karaskiewica, J., 1968, Biuletyn Instytutu Naftonwege 1, 1 a 3.
12. Johnson, A.C., 1979. en Conference on Microbiological Processes Useful in Enhanced Oil Recovery (US DOE Conf. 790871), págs. 30 a 34.
13. Conference on Microbiological Processes Useful in Enhanced Oil Recovery, 1979 (U.S. Department of Energy, Conf. 79871, UC-92).
14. Chatterjee, D.K., Kilbane, J.J. y Chakrabarty, A.M., 1982, Appl. Environ. Microbiol. (en prensa, número de agosto).
15. Kellogg, S.T., Chatterjee, D.K. y Chakrabarty, A.M., 1981, Science 214, 1133 a 1135.
16. Chakrabarty, A.M. and Brown., J.F., 1978, en Genetic Engineering (Chakrabarty, A.M., recop.). págs. 185 a 195. CRC Press, West Palm Beach, Florida.

