



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th 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.

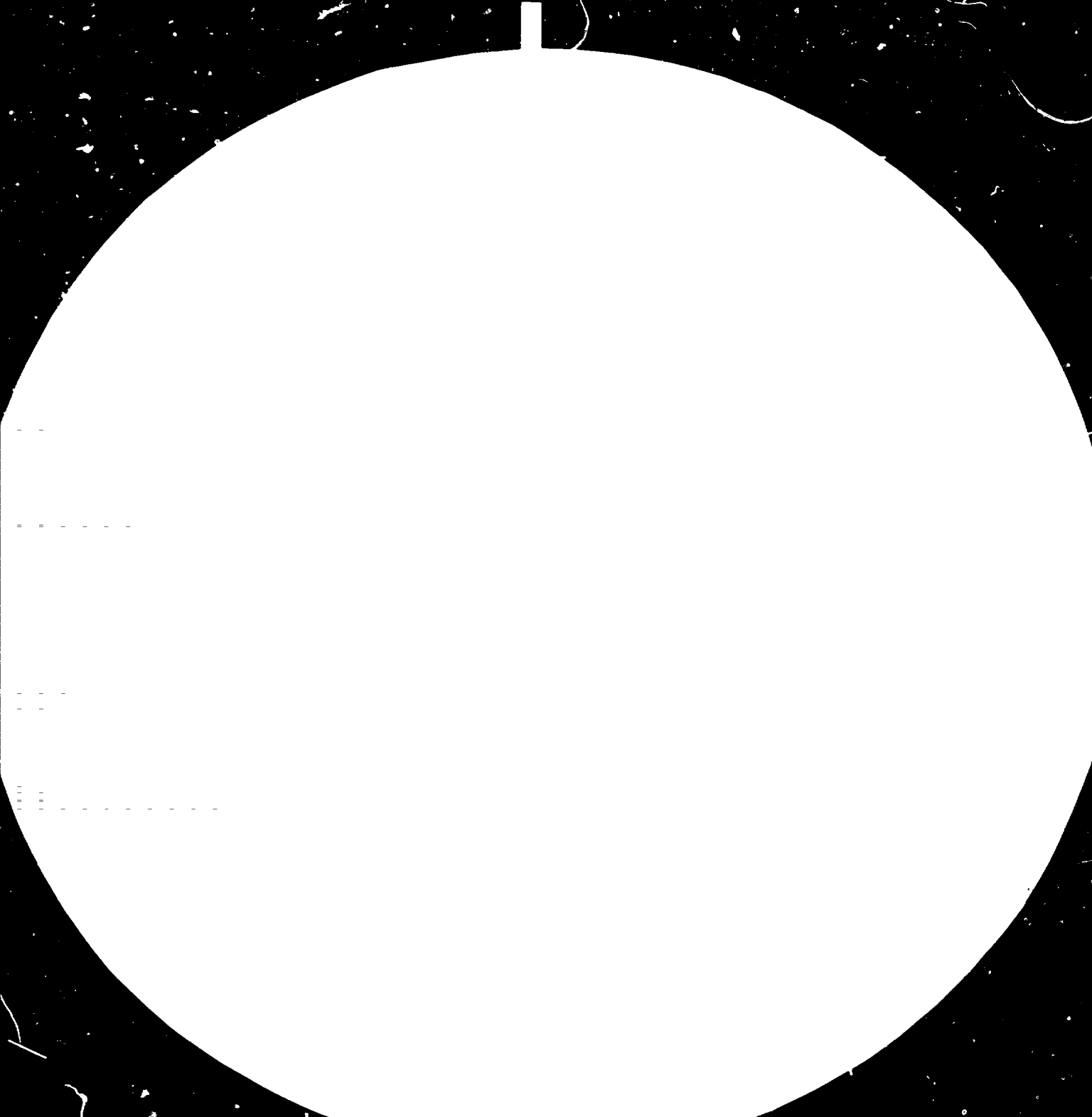
FAIR USE POLICY

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 for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org





1.0

28



2.5

30



2.2

32



2.0



1.1



1.8



11731 - F



Distr. LIMITEE

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

Organisation des Nations Unies pour le développement industriel

FRANCAIS

Original: ANGLAIS

Réunion de haut niveau sur l'établissement
d'un Centre international pour le génie
génétique et la biotechnologie

Belgrade (Yougoslavie), 13 - 17 décembre 1982

MICROBIOLOGIE DES HYDROCARBURES, NOTAMMENT
EN CE QUI CONCERNE LA RECUPERATION TERTIAIRE DU PETROLE *

Préparé par
Ananda Chakrabarty **

* Les opinions exprimées dans le présent document sont celles de l'auteur et ne reflètent pas nécessairement celles du Secrétariat de l'ONUDI. Traduction d'un document n'ayant pas fait l'objet d'une mise au point rédactionnelle.

** Professeur, Département de microbiologie et d'immunologie, University of Illinois at Medical Centre, 835 S. Wolcott Street, Chicago, Ill. 60680, USA.

Table des matières

| | <u>Page</u> |
|--|-------------|
| A. CONTEXTE ET JUSTIFICATIF | 1 - 3 |
| - Caractéristiques des micro-organismes | 3 - 5 |
| - Avantages et inconvénients du système de récupération microbienne de pétrole | 5 - 8 |
| B. ACTIVITES | 8 - 10 |
| - Construction de souches pour la récupération de pétrole tertiaire | 10 - 12 |
| - Déparaffinage et désulfuration du pétrole brut | 12 |
| - Nettoyage des pollutions du pétrole | 12 - 13 |
| C. PLAN DE TRAVAIL | 13 |
| D. COOPERATION AVEC D'AUTRES INSTITUTIONS | 13 |
| E. PREALABLES | 14 |
| F. BESOINS FINANCIERS | 14 |
| - Budget quinquennal | 15 |
| ANNEXE I | |
| BESOINS EN EQUIPEMENT | 16 - 17 |
| REFERENCES | 18 |

A. CONTEXTE ET JUSTIFICATIF

La capacité des micro-organismes de s'attaquer à la fois aux hydrocarbures aliphatiques et aromatiques présents dans le pétrole brut est bien connue (1,2). Des cultures bactériennes pures ou mélangées peuvent entraîner d'importantes modifications dans la composition du pétrole brut par une digestion totale ou partielle des composants hydrocarbures par le biais d'un métabolisme complet ou co-oxydant(3). Une telle croissance microbienne entraîne généralement une modification du pH du milieu et une altération des propriétés physico-chimiques du pétrole.

On sait également que la technologie actuelle de récupération du pétrole ne permet d'extraire que de 30 à 40 pour cent du potentiel de la plupart des puits. La plus grande partie du pétrole reste emprisonnée dans les roches en raison de son haut degré de viscosité. Selon des informations datant de 1976, il y a aux Etats-Unis une quantité de pétrole égale à 27×10^{10} barils ; 6×10^{10} ont déjà été extraits par les méthodes de récupération primaires , 3×10^{10} sont en cours d'extraction grâce à des processus améliorés de récupération et le reste, soit 18×10^{10} restent dans le sous-sol comme du pétrole "mort".

L'on ne saurait trop insister sur l'utilité des micro-organismes dans la récupération secondaire du pétrole. Jusqu'au milieu des années soixante-dix, le prix du pétrole aux Etats-Unis était réglementé et maintenu à un niveau nettement inférieur à celui de la plupart des autres pays du monde. Il n'y avait aucun encouragement à extraire davantage de pétrole que celui que l'on peut obtenir facilement grâce aux techniques disponibles. Depuis lors, le monde entier a connu une pénurie de pétrole qui a entraîné une flambée des prix. C'est en raison de cette pénurie que le prix du pétrole secondaire a récemment été libéré et que l'on a ressenti le besoin d'accroître la production de pétrole brut.

Bien que les moyens microbiologiques de récupération du pétrole secondaire n'aient pas été pris au sérieux aux Etats-Unis, il est établi que certains des concepts de cette technologie furent créés dans ce pays

au cours des années quarante et cinquante (4,56). Par contre, la récupération microbienne du pétrole secondaire a fait l'objet d'essais sur le terrain dans des pays d'Europe de l'est, particulièrement en Union des Républiques Socialistes Soviétiques (URSS), en Hongrie et en Tchécoslovaquie. Ainsi, des chercheurs soviétiques (7) ont signalé le dégagement couronné de succès de pétrole présent dans des réservoirs contenant du pétrole très visqueux et ayant une perméabilité de 1000md, grâce à l'injection de cultures mixtes de souches bactériennes. En Hongrie, des essais de grande ampleur sur le terrain ont prouvé l'applicabilité de la récupération microbienne de pétrole brut(8). Au cours d'une procédure d'essai typique, 20 mètres cubes d'un mélange composé de 120 m³ d'eau de source, 40 tonnes de mélèsses, 120 Kg de KNO₃ et 100 Kg de sucre ont été injectés dans un puits. Une culture bactérienne mixte a été additionnée à cette mixture. Cette culture mixte comportait des Pseudomonas, Clostridium et Desulfovibrio(9). Le puits fut fermé pendant trois mois; à la fin de cette période les résultats suivants furent enregistrés (Tableau 1).

Tableau 1
Modification de la composition du réservoir
après injection de micro-organismes dans un puits
de pétrole.

| Paramètre mesuré | Conditions | |
|-------------------------|----------------|-------------------------------|
| | Puits original | Après trois mois d'incubation |
| Production de pétrole | non spécifiée | 60% de plus qu'à l'origine |
| Viscosité du pétrole | 42 Centistokes | 18 cSt à 40°C |
| CO ₂ gazeux | 0 | 40 m ³ /jour |
| CO ₂ dissous | 0 | 370 mg/litre |
| pH eau du réservoir | 9 | 6 |

Une réduction similaire de la viscosité du pétrole et du pH de l'eau du réservoir fut notée au cours d'autres essais sur le terrain. Un autre essai typique dû à Karaskiewicz(10) a montré des modifications de viscosité de 10,67 centistokes à 4,37 cSt et une réduction simultanée du poids spécifique de 0,8516 à 0,8320. Il semble donc que des micro-organismes, capables de digérer les fractions lourdes du pétrole brut et produisant des fractions

légères de pétrole et de gaz sont responsables de telles réductions de viscosité (11).

Karaskiewicz a publié les résultats d'essais intensifs sur le terrain en Pologne(10). Au cours d'un essai typique, un puits de la région des Carpathes produisait 4460 kg de pétrole, 16.610 kg d'eau et 3.780 m³ de gaz par mois. La porosité de la roche de réservoir était de 13 pour cent et la perméabilité de 120 md. Une culture bactérienne mixte additionnée de nutriments fut injectée dans le puits qui fut ensuite scellé pendant trois mois. A la fin de cette période, la production de pétrole accusa une augmentation de 360% et cette production accrue (260% en moyenne) persista pendant six mois avant de redescendre au niveau précédent. Le pH de l'eau du réservoir tomba de 8,7 à 6,7 pendant cette même période.

Les essais sur le terrain concernant la récupération microbienne de pétrole aux Etats-Unis ont été peu nombreux (6) mais un rapport (12) souligne qu'une augmentation moyenne de production de pétrole dépassant 350% est possible à un coût variant grosso-modo entre 15 et 50 cents par baril supplémentaire. En outre, une recherche récente menée par Petrogen Inc. (communication à titre personnel du docteur A.G.Swan, Directeur de la recherche de Petrogen) au cours d'une période d'essais de 100 jours, vers la fin de 1981, portant sur quatre puits de pétrole à faible rendement traités à l'aide de micro-organismes spécialement adaptés (Biopackage 1) a permis de récupérer une quantité de pétrole pour une valeur de 24.800 dollars des Etats-Unis. Avant le traitement à l'aide de Biopackage 1, les quatre puits produisaient une quantité de pétrole valant environ 4.132 dollars au cours d'une période témoin de cent jours. Ainsi, le traitement microbien des puits de pétrole a eu pour résultat de multiplier par six la quantité de pétrole récupéré dans ce cas particulier.

Caractéristiques de micro-organismes

Les essais sur le terrain semblent démontrer la faisabilité de la récupération microbienne de pétrole secondaire de puits pétroliers abandonnés. Il convient de souligner que l'augmentation de pétrole due à l'injection de cultures microbiennes a probablement été minime puisque aucune précaution visant à utiliser des micro-organismes spécialement créés à cette fin n'a été prise. Il semble que dans la plupart des cas, la production accrue de pétrole était due à deux raisons :

- (a) production de grandes quantités de CO_2 due au métabolisme bactérien dans le réservoir. Etant donné que le CO_2 est partiellement miscible avec du pétrole, celui-ci gonfle et devient moins visqueux; et
- (b) Production de grandes quantités d'acide acétique, propionique et d'autres acides organiques qui réagissent avec le carbonate alcalin du réservoir pendant la formation; cette réaction entraîne une augmentation de la porosité des roches et de la production de CO_2 . L'excès de CO_2 et d'autres gaz exerce également une pression qui expulsera le pétrole des poches de sable et rocheuses.

Bien que sporadiques, les succès concernant la récupération microbienne de pétrole secondaire et l'augmentation continue des prix du pétrole (actuellement aux environs de 34 dollars Etats-Unis le baril) ont suscité un intérêt croissant pour l'étude et la mise au point de cette technologie en tant que moyen viable permettant une production accrue de pétrole, et tout particulièrement puisque le pétrole produit de cette manière serait libéré et bénéficierait dès lors d'un prix intéressant. Au cours d'un symposium organisé par le United States Department of Energy (13) le consensus selon lequel la récupération microbienne de pétrole est un but techniquement réalisable a été atteint. Lors de ce même symposium il a été dit que le processus pourrait probablement être amélioré de façon considérable si les micro-organismes utilisés avaient certaines caractéristiques favorables. Les caractéristiques suivantes ont été considérées comme particulièrement souhaitables:

(a) Production d'acides

Outre la production de CO_2 due à leur métabolisme, les micro-organismes devraient également pouvoir produire des acides in situ. De tels acides peuvent contribuer à la dissolution de structures rocheuses carbonneuses, accroître la porosité des roches afin de faciliter la migration et de permettre le dégagement de CO_2 complémentaire qui expulserait le pétrole prisonnier des roches. Il devrait s'agir d'acides minéraux puissants comme le HCl et le H_2SO_4 ou d'acides organiques comme l'acide acétique, propionique, succinique, etc.

(b) Production de biopolymères ou de surfactants

Les biopolymères et les surfactants sont couramment utilisés dans l'eau d'injection afin de réduire la tension de surface de l'interface eau/pétrole; ceci entraîne une diminution de la viscosité et une amélioration de l'écoulement du flux de pétrole. Idéalement, ces éléments devraient être produits in situ par des micro-organismes, assurant un apport continu de tels éléments dans des zones rocheuses difficiles d'accès et emprisonnant le pétrole. Cette méthode éliminerait le problème de transport, de stockage et de fourniture de tels produits durant l'injection d'eau.

(c) Consommation de composants à haute viscosité du pétrole

La moindre mobilité du pétrole secondaire est principalement due au degré élevé de viscosité de celui-ci. Les micro-organismes peuvent enlever, de manière sélective, les composants paraffinés et hautement visqueux du pétrole entraînant donc une réduction de la viscosité du pétrole; ainsi celui-ci peut être aisément récupéré par injection d'eau et pompage. De plus, à ce stade, toute perte de composants sulfurés aura pour conséquence la récupération de qualités de bruts à faible taux de sulfure, qualités qui généralement ont une valeur économique importante.

(d) Croissance et tolérance

Les micro-organismes jugés appropriés pour leur utilisation dans la récupération du pétrole secondaire doivent pouvoir se développer dans une plage étendue de températures (35°C à 45°C ou en-dessus), avoir des besoins nutritionnels simples, de préférence avec la capacité d'utiliser des substrats bon-marchés (et/ou des composants hautement visqueux du pétrole lui-même) en tant que seule source de carbone et utilisant du nitrate ou fixant du N₂ comme source d'azote. Ils devraient être non-pathogènes, écologiquement compatibles, faciles à produire en laboratoire en grandes quantités et facilement contrôlables par l'incorporation d'un marqueur génétique lié à une propriété unique liée à la croissance.

Avantages et inconvénients du système de récupération microbienne de pétrole.

- (a) Le plus grand avantage du système microbien est qu'il est simple et peu onéreux. L'injection de quelques centaines de litres d'un mélange de cellules mixtes et de nutriments dans un puits est relativement simple.
- (b) La technologie nécessaire à la récupération de pétrole est bien connue et le traitement n'implique pas d'innovations techniques majeures.
- (c) Il peut s'agir d'un processus à long terme puisque ces bactéries digèrent continuellement des fractions de pétrole très visqueuses et produisent des acides et des fractions légères. Les acides peuvent réagir en permanence avec les roches et par conséquent produire plus de CO_2 et accroître leur porosité, ce qui entraîne le dégagement d'une quantité de pétrole plus importante.

L'inconvénient majeur du processus est l'environnement extrême de la plupart des puits qui ne favorise pas un développement microbien soutenu. Les points suivants sont particulièrement importants:

- (a) Température: la plupart des puits les plus rentables sont très profonds et la température peut y varier entre 70 et 95°C en général. Ainsi, des micro-organismes mésophiles et modérément thermophiles ne pourraient pas proliférer dans de telles conditions.
- (b) Pression: bien que la pression ne constitue pas normalement un facteur à prendre en considération, une pression plus élevée dans certains puits (50 atm) peut réduire l'activité biologique dans un environnement déjà défavorable.
- (c) Nature des sables et des roches: bien que des roches carbonneuses puissent être graduellement corrodées par des acides obtenus par activité microbienne, les roches silicieuses sont assez résistantes à ces acides.

C'est la raison pour laquelle il semble que la récupération microbienne de pétrole, du moins au stade initial, doit être limitée à des puits peu profonds dont les structures rocheuses sont principalement alcalines ou charbonneuses. Si le processus permet une production pétrolière accrue, des bactéries thermophiles peuvent être conçues en se fondant sur les caractéristiques particulières du puits. Etant donné les grandes quantités de pétrole bloquées dans les roches, la pénurie et l'augmentation vertigineuse des prix du pétrole brut, et le faible coût du processus microbien, il est impératif que ce dernier soit mis à l'épreuve dans un certain nombre de puits afin d'évaluer son efficacité.

L'objectif principal du programme est d'accroître la récupération de pétrole dans des puits déjà forés et dont la plus grande partie du pétrole a déjà été extraite. C'est pourquoi ce programme entre dans la catégorie de la récupération secondaire et tertiaire du pétrole. Comme il y a d'innombrables puits de pétrole produisant moins d'un baril par jour dans les pays en développement, une augmentation de la production de pétrole grâce à la technologie de la récupération microbienne permettrait de réduire certains problèmes d'énergie dans ces pays. Un autre objectif serait de faciliter le stockage et le transport de brut en développant des bactéries via le génie génétique qui pourraient utiliser les composants paraffinés du pétrole brut et donc réduire fortement sa viscosité. Un tel pétrole peu visqueux et coulant généreusement est très rentable et riche moins de former une masse compacte pendant le transport durant les mois d'hiver, phénomène qui a pour effet d'accroître fortement le coût du pompage. Un pétrole bien fluide est également plus aisé à stocker dans des cavernes souterraines que le pétrole très visqueux. Un autre objectif encore serait de développer des micro-organismes capables d'utiliser les composants sulfurés contenus dans le brut. La désulfuration de pétrole brut peut dès lors s'effectuer grâce à l'utilisation de tels micro-organismes. Parallèlement aux composés organiques sulfurés, de nombreuses variétés de bruts contiennent également des métaux à l'état de traces et notamment le vanadium, le nickel, le molybdène, etc., qui diminuent la qualité du pétrole. Des micro-organismes capables de supprimer sélectivement ces produits seront également développés. Finalement, les pollutions dues au pétrole soit à la suite d'une opération délibérée de dégazage des pétroliers, soit à la suite

d'une collision de pétroliers ou de leur échouage peuvent être combattues par l'utilisation de micro-organismes créés grâce au génie génétique, ou encore par des agents émulsifiants produits grâce aux bactéries. Ces agents émulsifiants peuvent également trouver un très large champ d'application pour le nettoyage de résidus pétroliers présents dans des tonneaux, des réservoirs de voiture, de camions ou de pétroliers. Des essais sur le terrain devraient être réalisés sur des échantillons de pétrole prélevés dans des puits de divers pays en développement.

B. ACTIVITES

Puisque le programme de récupération de pétrole serait lié à plusieurs autres activités conjointement à la récupération tertiaire de pétrole c.a.d., extraction de paraffine minérale et désulfuration du pétrole, lutte contre les pollutions du pétrole, extraction de métaux présents dans le pétrole, il est évident que diverses activités seraient associées au programme. La composante principale de celui-ci serait constituée par les activités de recherche et de développement où la recherche dans les domaines sus-mentionnés serait menée sous la direction d'un chef de groupe associé au Centre International de Génie Génétique et de Biotechnologie (CIGGB). Trois chefs de projet environ, travaillant chacun avec un stagiaire (post-doctorat) et un technicien travailleront aux cinq projets. Cinq stagiaires originaires de pays en développement, de préférence des pays producteurs de pétrole, seraient formés dans les domaines de recherche déjà mentionnés; c.a.d. un stagiaire dans le domaine de l'extraction des paraffines, un stagiaire dans celui de la désulfuration, un troisième dans le domaine de l'extraction d'ions métalliques et deux dans le domaine du développement de cultures aérobies et anaérobies capables de dégager du pétrole de puits de pétrole abandonnés. Dans les pays riches en schistes ou en sables bitumineux (comme le Canada), certaines activités de recherche dans ce domaine pourraient être entreprises. Des ateliers annuels seront organisés par ce groupe en collaboration avec des groupes de microbiologie du pétrole, d'autres institutions des pays développés et en développement. Les thèmes pourraient couvrir le rôle des micro-organismes dans la dégradation d'hydrocarbures présents dans le pétrole brut, les facteurs limitants (c.a.d. nature du pétrole, pH, température, tension O_2 , etc.) dans de telles biodégradations, méthodes de stimulation de la biodégradation naturelle, améliorations génétiques dans la biodégradation d'hydrocarbures de diverses longueurs de

chaînes, etc. De plus, les travaux du groupe seraient guidés par un comité de conseil composé de généticiens, de microbiologistes, de spécialistes de l'écologie, de géologues et d'ingénieurs de réservoirs, ces spécialistes ayant pour rôle de donner des conseils sur les applications de micro-organismes construits dans les environnements ouverts, soit pour le nettoyage de pollutions dues au pétrole, déparaffinage et désulfuration, soit sur l'utilisation de tels micro-organismes dans les puits de pétrole pour l'amélioration de leur rendement.

De grandes installations pilotes permettant de réaliser des essais sur le terrain couronnés de succès seront nécessaires au CIGGB. Il y aura probablement des installations centralisées pour ces activités; dans la négative, plusieurs cuves de fermentation dont les capacités iront de 40 à 4.000 litres seront nécessaires. Un ou plusieurs techniciens capables de faire fonctionner ces cuves et de récolter les cellules devraient être recrutés à cette fin. Si une telle installation centrale n'existe pas, il faudra prévoir 180 m² supplémentaires pour abriter les installations de fermentation. Le coût de ces installations s'élèverait à environ 100.000 dollars.

En ce qui concerne les essais sur le terrain à proprement parler, les micro-organismes cultivés dans les cuves de fermentation, de même que les nutriments devraient être transportés près des puits de pétrole; ces divers éléments doivent ensuite être injectés dans le puits. Quelques camions équipés de dispositifs de pompage seraient nécessaires pour ce type d'opérations. On peut espérer que ce matériel sera fourni par les propriétaires ou les concessionnaires des puits de pétrole.

Le résultat essentiel du programme serait la construction de souches créées grâce au génie génétique et capables de déparaffiner et de désulfurer le pétrole brut des souches, capables d'utiliser rapidement le pétrole répandu par erreur, d'extraire certains métaux non désirables et finalement de dégager du pétrole très visqueux emprisonné dans des roches que l'on ne parvient normalement pas à extraire en utilisant la technologie actuelle. Certains de ces objectifs peuvent ne pas être atteints à l'issue du programme quinquennal. Même si des souches créées grâce au génie génétique peuvent être créées, l'efficacité de ces souches dans un environnement ouvert devra encore être vérifiée. Récemment encore, une autre souche créée grâce au génie génétique capable de digérer un produit chimique toxique comme le

2-4-5-T s'est avérée efficace dans la suppression de ce produit toxique de son environnement (14). C'est pourquoi les souches créées pour la libération de pétrole ou le déparaffinage/désulfuration de pétrole brut devraient être efficaces dans leurs champs d'application respectifs.

Construction de souches pour la récupération de pétrole tertiaire.

De nombreux paramètres liés à l'amélioration de la récupération microbienne du pétrole ont été évalués au cours d'une série d'études commanditées par le United States Department of Energy, l'une des conclusions les plus importantes issues de ces recherches laisse entendre que 30 à 40% des puits de pétrole de l'Oklahoma, du Texas, de la Louisiane, du Kansas, etc., sont adaptés à l'application de la technique de la récupération microbienne du pétrole, si les microbes et les processus adéquats peuvent être développés (voir rapport sur le United States DOE contract N° DE-AC10-80BC10169, 1981). Si l'on suppose que de tels micro-organismes peuvent être créés au CIGGB et qu'ils permettraient de récupérer 10 à 20 pour cent du pétrole résiduel, le formidable impact de cette technologie sur la disponibilité de pétrole brut dans le monde peut être envisagé aisément.

Le CIGGB devrait adopter deux types fondamentaux d'approches de recherche pour la construction de micro-organismes appropriés. L'une serait celle adoptée par le United States Department of Energy, à savoir: isoler des cultures thermophiles tolérant le sel et anaérobies, dans des stations d'épuration des eaux usées ou des noyaux de réservoirs de puits de pétrole. On peut alors tenter des améliorations mutationnelles ou d'autres améliorations génétiques afin d'améliorer la performance des cultures en ce qui concerne leur tolérance à des pH, taux de salinité, pressions, températures extrêmes etc., et améliorer leur capacité à transformer des produits paraffinés en pétrole liquide (voir rapports sur le United States DOE contracts DE-AT19-78BC30201, DE-AS19-80BC10302, DE-AS19-81BC10507, DE-AC19-80BCk0300, etc.).

Il convient de souligner que les anaérobies ne sont pas particulièrement adaptées aux programmes de dégagement optimum de pétrole. Les anaérobies ne se caractérisent pas par la rapidité avec laquelle elles peuvent biodégrader les hydrocarbures, ainsi; des sources de carbone facilement assimilables doivent être introduites dans les puits de pétrole pour permet-

tre leur prolifération. Deuxièmement, les études sur les anaérobies ne sont pas encore très élaborées; ainsi, des améliorations génétiques appréciables ne sont pas encore réalisables actuellement. Néanmoins, des expériences récentes avec des cultures anaérobies réalisées dans divers puits pétroliers au Texas et dans l'Oklahoma par Petrogen Inc. ont démontré que parmi 24 puits appartenant à six types de conformation différents, ayant des profondeurs allant de 100 à 1500 mètres dans lesquels des cultures anaérobies ont été injectées, quatre puits ont accusé un taux de production double de celui qui précédait l'injection et ce pendant une période de six mois alors que douze autres puits ont enregistré une augmentation de production de 50% par rapport aux niveaux de production avant injection. (Dr A.C. Swan, Directeur de la Recherche, Petrogen Inc, communication personnelle).

Une deuxième voie pour le programme de récupération microbienne de pétrole dans laquelle le CIGGB devrait s'engager est celle de la manipulation génétique de cultures aérobies, particulièrement à cet effet le type Pseudomonas. Il est notoire que les bactéries appartenant au type Pseudomonas ont la capacité d'utiliser des hydrocarbures comprenant les C20 et d'autres types paraffinés. Elles croissent rapidement à des températures allant jusqu'à 44 °C, tolèrent des hautes pressions, des taux de salinité assez élevés (la Pseudomonas marine s.p. tolère des taux de salinité très élevés), des variations de pH etc. L'on sait également que les Pseudomonas produisent des biopolymères polysaccharides et peuvent dégager de grandes quantités d'acides puissants comme l'HCl à partir de composés chlorés. Les outils génétiques permettant d'améliorer les Pseudomonas sont déjà assez développés. Le seul point d'achoppement dans l'utilisation de Pseudomonas est le fait que ces bactéries sont aérobies, bien que certaines espèces puissent assez bien se développer dans des conditions anaérobies en conjonction avec des nitrates jouant le rôle d'électrons accepteurs. Outre l'utilisation de nitrate, il est possible d'utiliser les techniques d'ADN recombinant pour introduire des gènes étrangers dans des espèces de Pseudomonas. Cette manipulation leur permettra de produire de l'oxygène in situ dans le puits même. Ainsi, la construction de bactéries Pseudomonas capables de digérer des matériaux très visqueux et paraffinés du puits de pétrole, produisant des polymères polysaccharides et du HCl à partir de composants chlorés et se développant dans un milieu anaérobie avec une production in situ d'oxygène, peut être réalisée au CIGGB. La construction de souches spécialisées de ce type et une étude relative à leur efficacité dans l'amélioration de la récupération de pétrole de puits abandonnés seront, pour ces raisons, un élément majeur

des projets du programme général au CIGGB. L'injection d'air dans les puits de pétrole de même que des souches de Pseudomonas génétiquement manipulées, luttant pour le dégagement de pétrole, fera également partie des essais sur le terrain du CIGGB.

Déparaffinage et désulfuration du pétrole brut

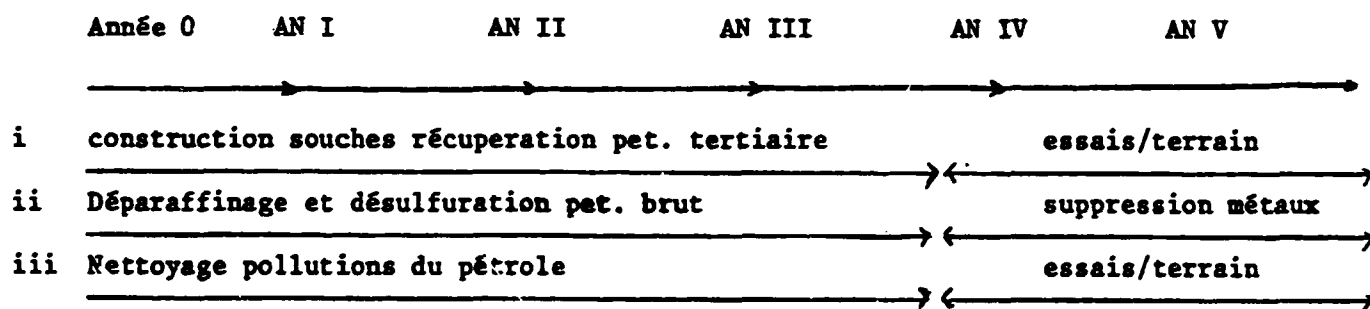
Des études génétiques récentes effectuées sur des Pseudomonas ont indiqué qu'il est possible de cultiver des souches particulières en laboratoire. Celles-ci peuvent utiliser un composé connu et persistant tel que l'herbicide 2,4,5-T (15). Comme il n'existe aucun micro-organisme, à l'état naturel, capable d'utiliser 2,4,5-T en tant qu'unique source de carbone, la création en laboratoire de telles cultures permet d'espérer que des souches similaires capables d'utiliser d'autres composants récalcitrants comme les dibenzothiophènes ou les furans (C_4H_4O), produits contenus dans le pétrole brut, pourront être créées. L'utilisation de cultures bactériennes capables de dissimiler les dibenzothiophènes en un produit hydrosoluble en extrayant 90% du soufre du pétrole brut a maintenant été démontrée. Puisque la présence de paraffine et de composés sulfurés dans le brut entraîne des problèmes de transport et de pollution, le développement de cultures capables de déparaffiner ou de désulfurer le brut pourrait être très utile. En outre, comme il a déjà été mentionné dans la section consacrée à la Récupération Améliorée de Pétrole (RAP), de telles caractéristiques apportées aux souches à utiliser dans la RAP permettraient non seulement de récupérer des pétroles de puits peu rentables mais également d'obtenir des prix très favorables puisque le déparaffinage et la désulfuration auront lieu in situ. De tels micro-organismes seraient tout particulièrement utiles pour traiter les pétroles bruts obtenus dans des pays comme la République Populaire de Chine, l'Indonésie, le Venezuela, le Nigeria etc. L'extraction de certains métaux présents dans le pétrole brut de certains pays sera aussi tentée grâce à l'utilisation de bactéries génétiquement manipulées.

Nettoyage des pollutions du pétrole.

Le CIGGB devrait également s'intéresser à un autre projet: la construction de souches multi-plasmides capables d'utiliser du pétrole répandu lors d'une pollution. Bien que le brevet général relatif à la construction et leur

utilisation soit détenu par la General Electric Company, il existe de très nombreuses possibilités d'améliorations de ces souches. Les détails concernant cette construction et les manipulations génétiques de ces souches ont déjà été décrits (16). Des approches similaires pourraient être adoptées au CIGGB afin de construire une souche plus efficace. L'utilité d'une telle souche dans la suppression de pétrole de pollution pourrait faire l'objet d'essais dans un grand nombre d'endroits: lacs et rivières d'eau douce, eaux de mer côtières et zones de haute mer etc. Ces essais ont pour but de vérifier l'efficacité de cette souche. Si cela s'avérait nécessaire, des souches distinctes pourraient être construites en fonction de la nature du pétrole de pollution, le statut écologique de l'eau (c.a.d. lacs d'eau douce contre eau de mer) etc.

C. PLAN DE TRAVAIL



D. COOPERATION AVEC D'AUTRES INSTITUTIONS

La coopération avec des instituts du pétrole et d'autres institutions appropriées sera organisée pendant le déroulement du programme.

La coopération avec des instituts et des agences nationales pour la réalisation d'essais sur le terrain constituera un élément substantiel du programme de travail.

E. PREALABLES

Un préalable majeur au programme est la formation universitaire des stagiaires originaires des pays en développement. Ces stagiaires doivent avoir une excellente formation en physiologie microbienne et en génétique, et une connaissance approfondie des techniques analytiques. Une sélection préalable des candidats devrait prendre en considération le type d'institution dans lesquelles les stagiaires retourneront, c'est à dire, si le stagiaire est employé dans un institut de pétrole plutôt qu'un institut médical ou une faculté universitaire des sciences de la vie, la possibilité que le stagiaire utilise son acquit dans le domaine de la récupération microbienne du pétrole ou du nettoyage des eaux polluées, sera plus importante dans la première hypothèse que dans les deux dernières. La même démarche s'appliquera aux stagiaires originaires des pays producteurs de pétrole par rapport à ceux de pays non producteurs, puisque la possibilité d'utiliser leur acquit sera plus grande dans le premier cas que dans le second.

Le coût des essais sur le terrain pourrait être ventilé entre le CIGGB et les concessionnaires des puits de pétrole particulièrement si les micro-organismes développés se révèlent très efficaces dans l'amélioration de la récupération de pétrole. Puisque la croissance de micro-organismes ou la fourniture de nutriments ne constituent pas des éléments onéreux, le coût de chaque injection dans un puits ne devrait pas dépasser 5000 dollars Etats-Unis. Dans certains cas, ce coût sera amorti par les bénéfices provenant du pétrole récupéré. En général, le coût total annuel des essais sur le terrain ne devrait pas dépasser 100.000 dollars.

F. BESOINS FINANCIERS

Le personnel suivant sera requis pour l'application du programme:

- deux scientifiques confirmés
- quatre scientifiques
- trois stagiaires (post doctorat)
- quatre techniciens

15 stagiaires participeront au déroulement du programme.

Budget quinquennal

| PERSONNEL | | (en milliers de dollars E.U.) |
|---|-----------------------|-------------------------------------|
| (première année 40% , deuxième année 60% de l'opération totale) | | |
| Scientifique confirmé | 8 hommes/année | 600 |
| Scientifique | 16 hommes/année | 720 |
| Scientifique niveau post-doctorat | 12 hommes/année | 288 |
| Techniciens | 16 hommes/année | <u>272</u> |
| | | |
| Sous-total | | 1.880 |
| | | |
| Gestion du Centre et personnel auxiliaire | | <u>489</u> |
| | | |
| Total personnel | | 2.369 |
| | | |
| ACTIVITES DE FONCTIONNEMENT | | |
| | | |
| Scientifiques visiteurs | 20 hommes/mois | 160 |
| Réunions groupes d'experts | 2 hommes/mois | 50 |
| Services conseils | 15 hommes/mois | 150 |
| Formation | 30 hommes/année | 675 |
| Matériel d'information | | 15 |
| Achats produits chimiques | 56 unités-homme/année | 560 |
| Associations | | 75 |
| Divers: | | <u>72</u> |
| | | |
| Total activités de fonctionnement | | 1.757 |
| | | |
| Total programme de travail | | 4.126 |

ANNEXE 1

BESOINS EN EQUIPEMENT

Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, ce programme impliquerait de deux à quatre membres du personnel du CIGGB et cinq à six stagiaires originaires de pays en développement. Cette estimation ne tient pas compte du personnel nécessaire pour la réalisation des essais sur le terrain. Comme ceux-ci seront réalisés en collaboration avec les concessionnaires des puits de pétrole et leur personnel d'ingénierie, le besoin de ce type de personnel au CIGGB n'est pas évident.

La réalisation de ce programme nécessite un laboratoire d'environ 460 mètres carrés doté de tables de travail, de hottes chimiques et de systèmes de contention biologiques. Cette estimation ne comprend pas l'espace de bureaux nécessaire au personnel. Il serait souhaitable de séparer la section de manipulations génétiques du laboratoire de celle consacrée à la physiologie microbienne afin d'éviter de trop gros problèmes de contamination. Le laboratoire devrait être équipé d'un appareillage moderne de préparation et d'analyse tel que:

- ultracentrifugeuses (Beckmans L8 ou DuPont OTD65)
- spectrophotomètres à enregistreurs (c.a.d. Gilford 2600 ou Beckman 35)
- centrifugeuses RC-2B et RC-5
- chromatographe en phase gazeuse (Varian 3700)
- chromatographe liquide à haute pression (Perkin Elmer série 2)
- Spectromètres à scintillation liquide (Packard Tri Carb ou Beckman L57000)
- oxygraphes Gilson et respiromètres différentiels
- électrophorèse et densimètre TLC
- lyophilisateurs
- cellules de pression françaises et sonicateurs
- agitateurs et incubateurs

En outre, le groupe de recherche doit avoir accès à des microscopes électroniques, chromatographie en phases gazeuses combinées- spectrométrie de masse, équipements d'analyse IR, NMR et ESR. Le coût de ces équipements pourrait atteindre 200.000 dollars.

REFERENCES

1. Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. 1977. *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 379-396.
2. Abbott, B.J. and Gledhill, W.E. 1971. *Adv. Appl. Microbiol.* 14, 249-388.
3. Perry, J.J. 1979. *Microbiol. Rev.* 43, 59-72.
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, 1469-1470.
7. Senjukov, B.M., Yulbarson, V.M., Talbukina, H.H. and Sisenina, E.P. 1970. *Mikrobiologia* 39, 705-710.
8. Jaranyi, I., Kiss, L., Szalanczy, G. and Szolnoki, J. 1965. Vorträge III. *Inter. Wiss. Konferenz Geochem. Microbiol.* 2, 633-650.
9. Jaranyi, I., Kiss, L. and Szalanczy, G. 1967. *Magyar All. Foldtari Int. Jelentese* 1967, 345-349.
10. Karaskiewicz, J. 1973. *Nafta* I, 144-151.
11. Karaskiewica, J. 1968. *Biuletyn Instytutu Naftonwege* 1, 1-3.
12. Johnson, A.C. 1979. in *Conference on Microbiological Processes Useful in Enhanced Oil Recovery* (US DOE Conf. 790871), pp 30-34.
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. and Chakrabarty, A.M. 1982. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press, August issue).
15. Kellogg, S.T., Chatterjee, D.K. and Chakrabarty, A.M. 1981. *Science* 214, 1133-1135.
16. Chakrabarty, A.M. and Brown, J.F. 1978. in *Genetic Engineering* (Chakrabarty, A.M., ed.). p. 185-195. CRC Press, West Palm Beach, Florida.

