

## RESEÑA ANALÍTICA

# Microbiología y biotecnología aplicadas a la exploración y producción petroleras

**Ramón Alberto Batista-García, Amalia Leandra Quesada-Quintero, Ayixon Sánchez-Reyes, Silio López-Guerra y Zulema Domínguez-Sardiñas.**

Centro de Investigaciones del Petróleo, Washington 169, esquina a Churrucá, Cerro, La Habana, Código Postal 12000, Cuba.  
Correo electrónico: batista@ceinpet.cupet.cu

Recibido: 13 de octubre de 2009.

Aceptado: 25 de enero de 2010.

Palabras clave: biotecnología, geomicrobiología, recuperación mejorada de petróleo con microorganismos.  
Key words: biotechnology, geomicrobiology, microbial enhanced oil recovery.

**RESUMEN.** La biotecnología es una poderosa herramienta para la solución de algunos problemas apremiantes de la humanidad. Por esta razón, ha tenido un gran desarrollo en las ciencias biomédicas y hoy día su aplicación se está extendiendo a la industria petrolera. La prospección de nuevos yacimientos petroleros es cada día, en áreas más difíciles, por lo que es necesaria la introducción de nuevas técnicas. Los microorganismos que oxidan metano, etano, propano y butano y metabolizan estos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, se emplean como indicadores de emisiones de hidrocarburos dependiendo de su densidad. Elevadas concentraciones de estos microorganismos permiten la identificación de anomalías microbianas de superficie y se consideran un método indirecto en la prospección de petróleo. Las técnicas microbianas aplicadas a la detección de hidrocarburos se definen como métodos que aumentan la eficiencia de la exploración cuando sus resultados se integran con otros métodos exploratorios. Otro uso novedoso de los métodos geomicrobiológicos lo constituye el aumento de la producción de los yacimientos petroleros. Como consecuencia, los métodos de producción que emplean microorganismos y sus metabolitos ganan importante espacio en las investigaciones científicas técnicas actuales. Los microorganismos y los productos de su metabolismo, en especial, los surfactantes, gases y polímeros, facilitan la movilidad de los hidrocarburos en el interior del reservorio, energizan el yacimiento y permiten su extracción. Otros métodos de recuperación de crudo combinados con la recuperación microbiana de petróleo pueden provocar un efecto sinérgico y estimular considerablemente la producción.

**ABSTRACT.** Biotechnology is a powerful tool for the solution of some mankind's urgent problems, for this reason has obtained a great development in biomedical sciences, and nowadays its application is being extended to Petroleum Industry. Oil exploration is every day in more complex areas, for this reason it is necessary to introduce new techniques. Microorganisms that oxidize methane, ethane, propane and butane and metabolize these hydrocarbons as a sole carbon source and energy are used as indicator hydrocarbons emissions depending on their density. High concentrations of these microorganisms allow the identification of microbial anomalies of surface and they are considered as an indirect method in oil prospecting. The microbial techniques applied to the detection of hydrocarbons are defined as a method that increases the exploration efficiency when its results are integrated with other exploratory methods. Another use of geomicrobiological methods is increasing oilfields production, as a consequence, the production method that uses microorganisms and their metabolites are more frequent as investigations scientific techniques. The microorganisms and the products of their metabolisms, mainly surfactants, gases, and polymers, facilitate mobility of hydrocarbons inside reservoir, they energize the oil and allow its extraction. Other methods of crude recovery combined with microbial enhanced oil recovery can produce a synergic effect and stimulate the production.

## INTRODUCCIÓN

La importancia de la industria petrolera a nivel mundial y en Cuba es indiscutible. La explotación de los yacimientos petroleros comenzó hace un siglo y, hoy día, la sociedad depende fuertemente del petróleo para la producción de energía y de materias primas para

diversas industrias.<sup>1</sup> En Cuba, la industria del petróleo se encuentra en franco desarrollo y crecimiento; el país cuenta con una creciente actividad de prospección de petróleo y gas natural, igualmente crecen las labores de extracción y la capacidad de refinación y producción en las refinerías.

## Correspondencia:

Ing. Ramón Alberto Batista García

Calle 128 B No. 8303, Apto. 4 entre Calles 83 y 85, El Palmar, Marianao, La Habana. Cuba. Correo electrónico: batista@ceinpet.cupet.cu

El petróleo y su industria caracterizan las sociedades de la época actual. De los yacimientos petroleros mundiales, cada año se extraen miles de toneladas del combustible fósil. La mayor parte del petróleo crudo se consume como combustible en forma de gasolinas, diesel y turbo combustible. Las fracciones más volátiles también se usan como combustibles, por ejemplo: metano, etano, propano y butano. Otra parte se consume como aceites y lubricantes en la industria eléctrica y los motores de combustión interna y como asfaltenos en la pavimentación de carreteras. Alrededor del 15 % del petróleo se utiliza como materia prima para la síntesis de plásticos, un grupo heterogéneo que incluye polialquenos (como el polietileno, polibutileno, polipropileno), poliestirenos y cloruro de polivinilo (PVC).<sup>1</sup>

El petróleo se define como una mezcla compleja de hidrocarburos y heterocompuestos con origen en la descomposición de la materia orgánica a través de largos períodos de tiempo.<sup>1,2</sup> Entre los componentes del petróleo se encuentran compuestos alifáticos, entre ellos, n-alcenos lineales y ramificados y cicloalcenos; aromáticos: benceno y derivados; asfaltenos, porfirinas y resinas de baja y elevada masas moleculares con presencia de piridinas, quinolinas y sulfonatos. También integran la mezcla según la naturaleza del petróleo: mercaptanos, tioésteres, entre otros. Además contiene otros elementos minoritarios como oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales tales como vanadio, cobalto, níquel, entre otros.<sup>3-7</sup>

Los alcanos o parafinas, familia más numerosa en los crudos de naturaleza parafínica, son lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 átomos carbono, aunque se detectan cadenas de hasta 60 átomos de carbono. Las moléculas cíclicas son saturadas o aromáticas. Los ciclos saturados, en los que varios átomos de carbono se unen entre sí por enlaces sencillos, se conocen como ciclo-alcenos, ciclo-parafinas o naftenos y son componentes minoritarios del petróleo crudo según su naturaleza, mientras los compuestos aromáticos son derivados del benceno. Los anillos se encuentran fusionados entre sí o sustituidos con cadenas alifáticas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) o poli núcleo-aromáticos comprenden del 10 al 25 % del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas. Los crudos ricos en metales pesados y azufre, así como en moléculas de elevada masa molecular, como las resinas y los asfaltenos se consideran petróleos de bajo valor.<sup>8</sup>

La destilación de los crudos permite la separación de las fracciones del petróleo de acuerdo con su volatilidad, tamaño y complejidad estructural, propiedades diferentes para cada una de ellas.<sup>9,10</sup> De esta manera, se logra la separación de los componentes más ligeros, gases de hasta cuatro átomos de carbono con temperaturas de ebullición sobre los 30 °C, hasta las fracciones más pesadas compuestas por más de 20 átomos de carbono con temperaturas de ebullición superiores a los 350 °C (Tabla 1).<sup>10-12</sup>

El descubrimiento de los ácidos nucleicos, la descripción detallada de los procesos de replicación y transcripción del ADN y ARN y síntesis de proteínas, así como la manipulación genética de los seres vivos, especialmente, de los microorganismos, generaron nuevas perspectivas de trabajo para la biotecnología moderna, entre ellas, la aplicación de la biotecnología a la industria petrolera. La descripción reciente de la estructura tridimensional de los ribosomas, mediante técnicas de cristalografía por RX, señala un camino de éxitos para la biotecnología y conducen a nuevas aplicaciones para la industria contemporánea. La comprensión de los mecanismos moleculares que garantizan la expresión de la información genética permite el avance y desarrollo de la biotecnología, incluidas las herramientas biotecnológicas de interés para la industria del petróleo. Hoy se reconoce la necesidad de introducir tecnologías limpias en el procesamiento del petróleo, reducir el consumo energético y disminuir la contaminación ambiental que genera la actividad petrolera. Por ello, la implementación y consideración de la biotecnología resulta imprescindible en proyectos de investigación y desarrollo que aborden el bioprocesamiento del petróleo para disminuir la contaminación; por ejemplo, la remoción biológica de azufre por bacterias; de metales por enzimas y la transformación de asfaltenos en crudos más ligeros por acción biológica, de manera que el producto adquiera mayor calidad y valor comercial con la ejecución de bioprocesos más limpios que los tratamientos tecnológicos clásicos.<sup>8</sup>

El tratamiento de desechos peligrosos y muy tóxicos constituye para las generaciones contemporáneas un tema de máxima importancia, el uso masivo de derivados del petróleo incrementa la concentración de los compuestos xenobióticos en el aire, las aguas y los suelos con nefastas consecuencias para la biota y el equilibrio dinámico de los ecosistemas. Sin dudas, las aplicaciones biotecnológicas serán imprescindibles en la solución de estas problemáticas.

La biotecnología y algunas de sus herramientas se aplican en la industria del petróleo, en muchos casos con éxitos incuestionables. Los principales campos de acción de la biotecnología y de la microbiología petrolera son la recuperación mejorada de petróleo (RMP), biocorrosión y biotratamientos con diferentes objetivos. En los procesos de RMP se emplean microorganismos y sus metabolitos para estimular la producción de crudo en el yacimiento; el estudio de la corrosión como consecuencia de la contaminación microbiana constituye otra área de especial atención, así como la búsqueda de nuevos inhibidores de corrosión producidos por microorganismos. La biorrefinación lista entre los biotratamientos de interés en las nuevas refinerías. La biodesulfurización y biodesnitrificación son estrategias que se emplean en los esquemas más avanzados e integrados de refinación de los derivados del petróleo. Por otra parte, la biorreme-

**Tabla 1.** Fracciones de petróleo crudo.

Nombre genérico de la fracción	Intervalo de ebullición (°C)	Número de átomos de carbono
Gases	30	3 - 4
Nafta	30 - 175	4 - 10
Kerosina	165 - 200	10 - 14
Diesel	176 - 365	15 - 20
Fracciones aceitosas	300 - 380	16 - 22
Compuestos pesados	> 350	> 22

diación y los tratamientos de aguas y efluentes gaseosos se consideran herramientas que disminuyen el impacto ambiental de las operaciones de la industria petrolera.<sup>8</sup>

El objetivo de esta reseña fue analizar la aplicación de métodos biológicos y biotecnológicos en la exploración y producción de petróleo.

## ORIGEN BIOLÓGICO DEL PETRÓLEO

Los combustibles fósiles, como el petróleo y el carbón de mina, se derivan de estratos geológicos de origen orgánico que se formaron hace millones de años. Se plantea que el petróleo proviene de grandes cantidades de plantas y animales marinos cuyos restos se cubrieron por sedimentos y formaron depósitos subterráneos. El material biológico que originó los depósitos de petróleo se encuentra fuertemente degradado, por lo que es complejo que se infiera los primeros pasos de su conversión. Sin embargo, existen otros tipos de yacimientos de hidrocarburos similares al petróleo conocidos como rocas sedimentarias químicas, a las que pertenecen la turba, el lignito pardo, el lignito y el carbón o la hulla, y su estudio ha permitido teorizar sobre las primeras etapas en la conversión de restos orgánicos en hidrocarburos. Las sustancias ricas en hidrocarburos producidas por la destilación de estos materiales son los kerogenos. El kerogeno se define como un complejo de materia vegetal y animal diagenéticamente transformada en el estado sólido y de origen sapropélico. El material de partida para los kerogenos son las plantas como los equisetos, los licopodios, los juncos, las cañas, los arbustos, los musgos pantanosos, entre otros. Las plantas crecieron en pantanos y lagos de agua dulce, los cuales se inundaron ocasionalmente por mares llanos en un clima subtropical hasta tropical. Con la ausencia de aguas subterráneas circulantes la descomposición normal de los restos vegetales, que se basa en la presencia de oxígeno, termina enseguida bajo la cobertura de sedimentos y de otros restos vegetales y se forman gases como el dióxido de carbono y el metano.<sup>8</sup>

A través de largos períodos de tiempo (millones de años), los restos pasaron por dos etapas de degradación, una biológica y otra abiótica. Se hipotetiza que en la primera etapa, los microorganismos anaerobios convirtieron los restos orgánicos en un material similar al kerogeno actual. Durante la fase abiótica siguiente, presiones elevadas y el calor cambiaron los sedimentos a rocas sedimentarias y el kerogeno a petróleo. La conversión se catalizó por metales y por las mismas arcillas de los estratos. Como consecuencia de la acumulación de gases (metano, principalmente) que funcionan como propulsor, los pozos subterráneos de petróleo se movilizan hacia los poros y fracturas de las rocas y eventualmente afloran de manera espontánea a la superficie del suelo.<sup>8</sup>

Desde el punto de vista microbiológico, la identificación de los microorganismos participantes en la formación del kerogeno constituye todo un reto, se trata de organismos microscópicos que existieron hace millones de años y cuyos remanentes se localizan enterrados a cientos de metros de profundidad. Sin embargo, se identifican algunas especies microbianas viables asociadas a depósitos de petróleo en explotación mediante herramientas moleculares, aunque no se asegura que provienen del yacimiento y no de contaminación con especies contemporáneas. Una alternativa novedosa es la búsqueda de microfósiles asociados a yacimientos de kerogeno. Bajo condiciones especiales se identifican algunos de estos microfósiles como miembros de los grupos cianobacterias y protozoarios.<sup>8</sup>

Como alternativa, se intenta la identificación de cierto tipo de moléculas orgánicas que solo provienen de organismos vivos, ya sean procariontes o eucariontes. Estos fósiles moleculares se conocen como bioindicadores o biomarcadores y se derivan de los lípidos celulares y de membranas. Un estudio de esta naturaleza se aplicó en un yacimiento de kerogeno en Australia y permitió que se estableciera que los tres dominios de organismos vivos (*Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya*), existen hace 3 800 millones de años y se consideran participantes potenciales en la fase biológica de la formación del petróleo.<sup>8</sup>

## Procesos microbianos en la industria petrolera

La industria petrolera es inminentemente química, muchos la consideran la industria química por excelencia, de mayor complejidad estructural y operacional. Se exploran actualmente nuevas metodologías y tecnologías que aumenten su rentabilidad y la eficiencia de sus operaciones. Los precios del petróleo cayeron en los últimos meses y las reservas de hidrocarburos ligeros se agotan con su explotación. Los derrames de petróleo y sus derivados durante las acciones de perforación, extracción, refinación y comercialización son frecuentes y causan un severo daño ambiental, en muchos casos irreversibles. Ante estas realidades, los procesos microbianos ganan un importante espacio en la industria petrolera. Cada vez se le presta más atención a las metodologías que comprenden microorganismos y sus productos metabólicos con potencialidades de aplicación industrial. La biotecnología y la microbiología encuentran aplicación en los procesos de exploración, producción, refinación y tratamiento de desechos. Los bioprocesos que se emplean en la industria del petróleo se basan en el metabolismo microbiano y en la interacción de sus metabolitos con el crudo y sus derivados. Otras aplicaciones se soportan en la búsqueda de microorganismos o biomoléculas indicadoras para evidenciar la ocurrencia de un fenómeno, como por ejemplo, eventos de biocorrosión y acumulaciones de hidrocarburos. Cuba, país con desarrollo creciente y sostenido en la búsqueda, perforación, producción y refinación de petróleo, no exhibe avances notorios en el desarrollo de herramientas biotecnológicas aplicadas a la industria petrolera, por lo que constituye una prioridad para la comunidad científica nacional la investigación y desarrollo de nuevas y propias metodologías biotecnológicas para su inserción en la industria nacional.

## Microorganismos y exploración de petróleo

Los métodos de exploración de petróleo mediante técnicas microbiológicas forman parte de los métodos de prospección geoquímica de superficie. La exploración geoquímica de superficie investiga la presencia de hidrocarburos químicamente identificables que se encuentren en la superficie o cerca de ella, o los cambios que se inducen por la presencia de esos hidrocarburos en el suelo. Las evidencias que se obtienen de estos estudios permiten localizar en el subsuelo acumulaciones de hidrocarburos.<sup>13</sup>

La expresión geoquímica de superficie de las microfugas de hidrocarburos toma formas diferentes:<sup>13,14</sup>

- Concentración anómala de hidrocarburos en sedimentos, suelos, aguas y también en la atmósfera.
- Anomalías microbiológicas.
- Formación de lutitas parafínicas.
- Presencia de gases anómalos no relacionados con hidrocarburos, tales como el helio y el radón.
- Cambios mineralógicos en el suelo como la formación de calcita, pirita, uranita, azufre elemental, así como ciertos sulfuros y óxidos de hierro.

- Alteraciones de minerales de arcilla.
- Anomalías de radiación.
- Anomalías geotermales e hidrológicas.
- Decoloración de las capas rojas.
- Anomalías geobotánicas.
- Alteraciones acústicas, eléctricas y magnéticas del suelo y los sedimentos.

Los métodos de prospección microbiológica en la exploración de yacimientos de petróleo se utilizan desde hace cinco décadas. La base científica de estos métodos de exploración y prospección de petróleo consiste en la migración de hidrocarburos ligeros gaseosos, como: metano (C<sub>1</sub>), etano (C<sub>2</sub>), propano (C<sub>3</sub>) y butano (C<sub>4</sub>), desde el reservorio hasta la superficie del yacimiento y en la asimilación de estos compuestos hidrocarbonados por grupos específicos de microorganismos que habitan el subsuelo de estos ecosistemas.<sup>14</sup> Existen bacterias que oxidan metano, etano, propano y butano, y que además, usan exclusivamente estos gases como única fuente de carbono y energía para su crecimiento. La densidad de estas bacterias varía de áreas con presencia de hidrocarburos respecto a otras donde no se localizan reservorios de petróleo.<sup>15</sup> El aislamiento y enumeración de bacterias que oxidan esos hidrocarburos se usan como método indirecto en la prospección de petróleo. Algunos estudios informan una relación directa y positiva entre la densidad de estos grupos microbianos y la concentración de hidrocarburos en el suelo.<sup>14</sup> La aplicación de estos métodos en la exploración de petróleo se discute fuertemente en la actualidad.

Las técnicas microbiológicas modernas permiten la detección de forma indirecta de la presencia de hidrocarburos livianos (hidrocarburos con hasta cuatro átomos de carbono) en suelos y el mapeo de su extensión con precisión.<sup>14</sup> Las condiciones petrofísicas de las rocas reservorio presentan connotaciones geológicas interesantes, ya que un reservorio pobre, con baja permeabilidad, no favorece el escape de hidrocarburos, mientras que uno de muy buena permeabilidad permitirá una migración activa desde el reservorio hasta la superficie. Una anomalía microbiológica en superficie se asocia a fases porosas y permeables del reservorio y con la presencia de hidrocarburos, además permite la localización de trampas estratigráficas.<sup>13</sup>

Las bacterias que oxidan metano se encuentran con predominio en el subsuelo de cualquier reservorio, ya que el metano constituye el gas en mayor proporción y el hidrocarburo más liviano, por tal razón, se favorece su difusión del reservorio a la superficie.<sup>16</sup> Los grupos bacterianos que con mayor frecuencia se informan con la potencialidad de oxidar hidrocarburos ligeros son: *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*.<sup>11,13-16</sup> Los citados grupos microbianos se consideran bacterias indicadoras y su existencia en cantidades anómalas se relaciona con la presencia de hidrocarburos en el subsuelo. Se informa que el éxito de estas metodologías es igual o superior al 90 %. El método se integra con los datos experimentales que aportan otros métodos geológicos, geofísicos y geoquímicos que evalúan la presencia de hidrocarburos en un área determinada y contribuye a disminuir el riesgo exploratorio y a potenciar el éxito de la actividad de exploración de petróleo. Entre las técnicas de valor exploratorio que se contemplan para la integración de los resultados resaltan el complejo redox y el análisis cualitativo y cuantitativo de gases absorbidos y libres.<sup>13</sup> Se informan relaciones inversamente proporcional entre las cantidades de microorganismos

y de gases libres y absorbidos, de manera que cuando se detecta un máximo de actividad microbiana, se cuantifica un mínimo de gases, de acuerdo con el consumo de estos por los microorganismos.<sup>14</sup>

Las técnicas de prospección geomicrobiológicas son de máximo interés para muchos países y numerosos grupos de investigación apelan a su estandarización. Varios países como Libia, Irán, Estados Unidos, Brasil y en especial, la India, informan resultados relevantes en el tema. En Cuba, no existen experiencias en estos estudios y la aplicación de estas técnicas ayudaría a la localización de nuevos reservorios en tierra y a la disminución del riesgo exploratorio en las acciones de prospección de los yacimientos nacionales.

La exploración geomicrobiológica de petróleo ofrece algunas fortalezas: valor exploratorio según las experiencias internacionales, complementa criterios geológicos con criterios geomicrobianos en los procesos de exploración de petróleo, asumiendo posiciones multidisciplinarias en las experiencias exploratorias e informa sobre la presencia de hidrocarburos en el perfil vertical de la zona de muestreo. De igual modo, presenta algunas desventajas tales como: no ofrece información cuantitativa respecto a la presencia de hidrocarburos ni sobre la composición hidrocarbonada del reservorio.<sup>13,17</sup>

### Recuperación mejorada de petróleo con empleo de microorganismos

Las reservas de petróleo tienen una capacidad de producción limitada, por lo que se prevé su agotamiento en el futuro. El descubrimiento de nuevos yacimientos con grandes reservas de crudo ocurre cada vez con menos frecuencia y los esfuerzos se abocan hacia la recuperación del que permanece aún entrampado dentro del yacimiento y que no fluye espontáneamente a través de los pozos de producción.<sup>18-20</sup>

Del total de crudo presente en un yacimiento, solo se recupera de un 10 a un 50 % por métodos convencionales. Por esta razón, existe gran interés en el desarrollo de metodologías químicas y físico químicas que permitan recuperar parte del petróleo remanente en el yacimiento.<sup>21</sup> Estas metodologías se agrupan en los procesos de Recuperación Mejorada de Petróleo (RMP).<sup>22</sup> El desarrollo de métodos microbiológicos para aumentar la producción de petróleo comenzó a considerarse desde la mitad del siglo pasado. Los procesos microbiológicos de RMP se sustentan en el aprovechamiento de los metabolitos producidos por los microorganismos durante su crecimiento<sup>23-25</sup> y se consideran ventajosos respecto a las variantes físico químicas por ser más económicos al consumir menos energía, no depende de los precios del petróleo y no emplea sustancias químicas agresivas al medio ambiente.<sup>26,27</sup> Los metabolitos microbianos disminuyen las tensiones interfacial y superficial en el sistema, reducen la viscosidad del crudo, aumentan la permeabilidad del reservorio, desplazan el crudo de la matriz del yacimiento y facilitan los procesos de extracción.<sup>28,29</sup> Entre los metabolitos microbianos de interés en estas metodologías se encuentran: polímeros, gases, ácidos carboxílicos, hidroxiácidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, peróxidos orgánicos, ésteres, aunque de especial interés son los biosurfactantes.<sup>30</sup> Los biosurfactantes disminuyen la tensión interfacial entre dos fluidos y los requerimientos de presión en el yacimiento, hechos que permiten el desplazamiento del crudo.<sup>31</sup>

La búsqueda de nuevas cepas y metabolitos con aplicación en procesos de Recuperación Mejorada de Petróleo constituye una prioridad para muchos grupos de

investigación.<sup>32</sup> Específicamente, la búsqueda de nuevos bioproductos con principios surfactantes constituye una premisa para la biotecnología contemporánea aplicada a la extracción del petróleo.<sup>33</sup> La industria del petróleo en Cuba exige esfuerzos y voluntades multidisciplinarias para el tratamiento de los yacimientos y crudos cubanos. La aplicación de métodos físicos y químicos para la estimulación de la producción de petróleo son usados en Cuba, sin embargo, no existen en el país métodos microbiológicos estandarizados ni productos de origen microbiano para aplicar en procesos de Recuperación Mejorada de Petróleo. Países como Irán, Brasil, India, Rusia, Turkía, China, Estados Unidos y Korea, entre otros, apelan actualmente a la búsqueda de nuevas cepas microbianas con potencialidades de producir bioproductos a partir de variadas y baratas fuentes de carbono y energía, hecho que demuestra la actualidad e importancia de este tema.<sup>28-39</sup>

Segnini *et al.*<sup>34</sup> aislaron de la formación petrolera brasileña Carmópolis Basin la cepa *Klebsiella pneumoniae* con potencialidades de aplicación en procesos de RMP. Los estudios microbiológicos concluyeron que la cepa es viable luego de 91 d de conservación en medio salino y además, como consecuencia de los cambios morfológicos celulares penetra fácilmente en los poros del reservorio modelado. Se construyeron en el laboratorio reservorios con dimensiones y tipos de poros diferentes para evaluar la remoción de crudo a partir del impacto de los metabolitos excretados y de la interacción de las células bacterianas con los poros de los yacimientos modelados. El uso de cepas de *Klebsiella pneumoniae* en estimulación a pozos de petróleo debe considerarse de acuerdo con su carácter patógeno.

El grupo de los bacilos halotermófilos Gram positivos formadores de esporas es uno de los grupos microbianos de interés en las estrategias de Recuperación Mejorada de Petróleo mediante microorganismos. Dastgheib *et al.*<sup>31</sup> informaron el aislamiento de la cepa *Bacillus licheniformis* sp. ACO1 de un reservorio de petróleo de Irán con crecimiento óptimo a 45 °C, pH 8 y resistente a 180 g · L<sup>-1</sup> de cloruro de sodio. Esta cepa mostró elevada capacidad para producir bioemulsificantes, aunque no creció en presencia de hidrocarburos como fuente de carbono. La producción de emulsificantes resultó óptima en medio con extracto de levadura como fuente de carbono y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Estudios de laboratorio demostraron la recuperación de petróleo residual en 22 % cuando se empleó un tratamiento con la cepa ACO1.

Por otra parte, experimentos en el laboratorio demostraron que el surfactante producido por *Bacillus subtilis* 20B removió el 30,22 % del petróleo contenido en una columna empaquetada con arena y petróleo.<sup>35</sup> Esta bacteria mostró otras cualidades de interés para los procesos de RMP como crecer a 55 °C y tolerar 7 % de cloruro de sodio. La cepa produjo el surfactante a partir de diversas fuentes de carbono: glucosa, alcohol e hidrocarburos.

*Bacillus amyloliquefaciens* LP03, aislado de una muestra de suelo, produjo un lipopéptido con actividades surfactante y emulsificante. Se identificó que el lipopéptido, de 1 022,6 Da de masa molecular, lo componen cuatro aminoácidos: glutamina (Glu), leucina (Leu), metionina (Met) y prolina (Pro), organizados en la secuencia de siete aminoácidos siguiente: Glu-Leu-Met-Leu-Pro-Leu-Leu y por el ácido graso β-hidroxi-C13. El lipopéptido identificado difirió de las surfactinas y se clasificó como un nuevo lipopéptido: bamilomicina A.

En la purificación del lipopéptido se usaron métodos de precipitación ácida, extracción por precipitación en metanol, cromatografía en columna de gel sílice y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Pressure Liquid Chromatography), mientras que, en los análisis de composición molecular del metabolito se utilizaron técnicas analíticas como la espectrometría de masas y HPLC.<sup>25</sup>

*Serratia marcescens* MTCC 86 produjo un lípido con elevada actividad emulsificante durante su crecimiento en sucrosa. El lípido compuesto por unidades de 3-(3'-hidroxitetradecanoxi) y 3-(3'-hidroxihexadecanoxi) resultó efectivo a nivel de laboratorio, ya que removió el 90 % del crudo en una columna empacada con arena y petróleo, hecho que demuestra la potencialidad del producto microbiano en procesos de RMP. El producto también mostró efectividad al remover petróleo impregnado en las paredes de contenedores de almacenamiento. Para los estudios de estructura molecular, se realizaron extracciones con acetona, cloroformo y metanol y posteriormente, se aplicaron técnicas analíticas tales como cromatografía en capa delgada, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas y espectroscopia infrarroja.<sup>32</sup>

Los dos ejemplos anteriores demuestran la importancia de los métodos analíticos espectroscópicos y cromatográficos en la identificación y caracterización molecular de los metabolitos producidos durante el crecimiento microbiano. Una adecuada metodología de purificación, basada en estrategias de sucesivas precipitaciones con disolventes, evaporización y extracción, seguida de la disposición de técnicas analíticas, permiten informar sobre los detalles estructurales de la composición molecular del metabolito de interés. La estructura molecular permite que se explique, o al menos teorice, sobre los fenómenos moleculares que ocurren en el sistema en estudio y la función de las entidades moleculares que se identifican.

Wang *et al.*<sup>29</sup> demuestran que los procesos de RMP con microorganismos son factibles. Inocularon dos pozos petroleros (26-195 y 27-221) con tres cepas de bacterias exógenas y luego de la inyección microbiana, el pozo se cerró durante un tiempo. Cuando comenzó la producción, se comprobó un aumento en los volúmenes de crudo extraído de 1,58 y 4,52 toneladas diarias en los pozos 26-195 y 27-221 respectivamente, comparado con los volúmenes de producción obtenidos antes del tratamiento. Los análisis electroforéticos de las muestras de crudo tomadas durante el proceso indicaron que las proteobacterias predominaron en el yacimiento. Otra experiencia productiva a partir del empleo de RMP con microorganismos la desarrolló Behlulgil *et al.*<sup>36</sup> en un reservorio turco de petróleo pesado. El reservorio se inoculó con *Clostridium acetobutylicum* y luego del tratamiento, la producción aumentó en 12 %, además, se comprobaron cambios en el pH y la viscosidad del crudo.

La producción de biosurfactantes en el interior del yacimiento se demuestra en los estudios de Youssef *et al.*<sup>28</sup> cuando comprobaron la síntesis de un biosurfactante lipopeptídico en un reservorio inoculado con un cultivo mixto de dos cepas de *Bacillus* (*Bacillus* RS-1 y *Bacillus subtilis* subs. *spizizenii* NRRL B-23049) y nutrientes (glucosa, nitrato de sodio, trazas de metales). La concentración de biosurfactantes alcanzó 90 mg · L<sup>-1</sup>, concentración nueve veces superior a la requerida para remover el petróleo de los poros de las rocas, según estudios de laboratorio de este mismo grupo de investigación. En los pozos inoculados se detectó dióxido de carbono, acetato, lactato y 2,3-butanodiol. El estudio permitió la

modelación cinética de procesos microbianos de RMP y se calcularon los intervalos de crecimiento ( $0,06 \pm 0,01$ )  $h^{-1}$ , el balance de carbono ( $107 \pm 34$ ) %, la producción de biosurfactante ( $0,02 \pm 0,001$ )  $h^{-1}$  y el rendimiento de producción del biosurfactante [ $(0,015 \pm 0,001)$  mol biosurfactante  $\cdot$  mol $^{-1}$  de glucosa]. Los resultados experimentales permitieron demostrar la factibilidad de los procesos microbiológicos de RMP.

Aunque estos ejemplos demuestran las ventajas de las variantes microbianas de RMP, muchos empresarios se muestran escépticos al asunto. La estequiometría del proceso, así como los rendimientos y las concentraciones de productos en las condiciones del yacimiento, son aspectos que deben sistematizarse. Otros aspectos de importancia son la movilización del crudo por acción de los metabolitos microbianos, el período de vida media de estas moléculas orgánicas, el rango de actividad biológica en las condiciones reológicas y de pH, temperatura y fuerza iónica del reservorio y las técnicas de control y seguimiento de las concentraciones de microorganismos y metabolitos en el yacimiento.<sup>23,37-39</sup>

## CONCLUSIONES

La biotecnología constituye una estrategia imprescindible para el desarrollo de la industria petrolera cubana, de manera que la convierta en una industria competitiva y ecológicamente sostenible.

La detección y enumeración de grupos microbianos que oxiden hidrocarburos ligeros se emplea como método indirecto en la prospección de hidrocarburos y disminuye el riesgo exploratorio en las actividades de búsqueda de petróleo.

La prospección geomicrobiana de hidrocarburos resulta una metodología atractiva para la exploración nacional de crudos, si se consideran las características de los yacimientos cubanos en tierra.

Los microorganismos y sus metabolitos aumentan la energía de los yacimientos de petróleo y permiten mediante diversos procesos la recuperación del hidrocarburo que permanece en el yacimiento.

Los métodos de recuperación mejorada de petróleo constituyen una propuesta alternativa de tratamiento a pozos y yacimientos petroleros, con impacto en la producción, a la vez que garantizan extracciones más seguras y disminuyen los daños físicos y químicos a la formación del yacimiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhang X, Lai K, Wang S. A new approach for crude oil price analysis based on Empirical Mode decomposition. *Energy economics*. 2008;30:905-918.
2. Pereira J, Mello P, Morales D, Duarte F, Dresster V, Knapp G, *et al.* Chlorine and sulfur determination in extraheavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. *Spectrochimica Acta Part B. Atomic Spectroscopy*. 2009;64:55-558.
3. Boukadi A, Philp R. Characterization of paraffinic deposits in crude oil storage tanks using high temperature gas chromatography. *Applied Geochemistry*. 2005;20:1974-1983.
4. Eudokimou I. Bifurcated correlations of the properties of crude oils with their asphaltene content. *Fuel*. 2005;84:13-28.
5. Fortuny M, Silun E, Filho A, Melo R, Nele M, Loutinho R, *et al.* Measuring salinity in crude oils: Evaluation of methods and an improved procedure. *Fuel*. 2008;87:1241-1248.
6. Bohne A, Skadsheim A, Goksoyr A, Einar B. Candidate biomarker discovery in plasma of Juvenile cod (*Gadus morhua*) exposed to crude north sea oil, alkyl phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine Environmental Research*. 2009;5:125-129

7. Pan M, Li X, Quian Y. New approach for scheduling crude oil operations. *Chemical Engineering Science*. 2009;64:965-983.
8. Valderrama Blenda. *Microbiología del petróleo y sus derivados*. 2002 [Consultado 10 de octubre de 2009]. Disponible en: [www.microbiología.org.mx](http://www.microbiología.org.mx)
9. Leahey J, Colwell R. *Microbiology and petroleum*. *Microbiol Rev*. 1990;54:305-315.
10. Starkey L, Smith B, Bruno T. Advanced distillation curve measurements for corrosive fluids: application to two crude oils. *Fuel*. 2008;87:3055-3064.
11. Clak R. *Marine pollution*. 2nd ed. Oxford: Oxford Scientific Press: 1998:312-316.
12. Shishkin Y. A new quick method of determining the group hydrocarbon composition of crude oils and heaviness residues based on their oxidative distillation (cracking) as monitored by differential scanning calorimetry and thermogravimetry. *Thermochimica Acta*. 2006;440:156-165.
13. Rasheed M, Veena M, Satish T, Patil D, Dayal A. Geomicrobial prospecting method for hydrocarbon exploration in Vengannapalli Village, Cuddapah Basin, India. *Current Science*. 2008;95:361-366.
14. Horvitz L. On geomicrobail prospecting. *Geophysics*. 1939;4:210-228.
15. Tucker J, Hitzman D. Detailed microbial surveys help to improve reservoir characterization. *Oil Gas J*. 1994;6:65-79.
16. McLee A, Kormendy A, Wayman M. Isolation and characterization of n-butane utilizing microorganisms. *Can J Microbiol*. 1972;18:1191-1195.
17. Singh R. *Surface Exploration Techniques for Hydrocarbons: An Overview*. *Journal of the Petroleum Society*. 2008;12:26-38.
18. *Energy for a new century: increasing domestic energy production*. National energy policy report of the National Energy Policy Development Group. U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 2001.
19. Hall C, Tharakan J, Hallock J, Cleveland C, Jefferson M. Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature*. 2003;426:318-322.
20. Planckaert M. *Oil reservoirs and oil production*. 3th ed. Washington: Ollivier-Magot: 2005:p.3-19.
21. Richardson, TX *Enhanced oil recovery*. Society of Petroleum Engineers. 2005.
22. Altunina L, Svarovskaya I, Ovsyannikova V. Microbiological aspects of a combined physicochemical process for enhanced oil recovery. *Petroleum Chemistry*. 2007;48:233-237.
23. Li Q, Kang C, Wang H, Liu C, Zhang C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing oil field. *Biochem. Eng J*. 2002;11:197-199.
24. McInerney M, Nagle D, Knapp R. *Microbially enhanced oil recovery past, present and future*. 3th ed. Washington: Ollivier-Magot: 2005:p.215-237.
25. Sang L, Sun K, Hye P, Chung S, Choi Y. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Arch Microbiol*. 2007;188:307-312.
26. Brown L, Vadie A, Stephens J. Slowing production decline and extending the economic life of an oil field: new MEOR technology. *SPE Reservoir Eval Eng*. 2002;5:33-41.
27. McInerney M, Maudgalya S, nagle D, Knapp R. Critical assessment of the use of microorganisms for oil recovery. *Recent Res Dev Microbiol*. 2002;6:269-284.
28. Youssef N, Simpson D, Duncan K, McInerney M, Folmsbee M, *et al.* In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied Environmental Microbiology*. 2007;73:1239-1247.
29. Wang J, Ma T, Zhao L, Lv J, Guoqiang L, Zhuang H, *et al.* monitoring exogenous and indigenous bacteria by PCR-DGGE technology during the process of enhanced oil recovery. *J Ind Microbiol. Biotechnol*. 2007;35:619-628.
30. Etoumi A, Musrati I, Gammoudi B, Behlil M. The reduction of wax precipitation in waxy crude oils by *Pseudomonas* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35:1241-1245.
31. Dastgheib S, Amoozegar M, Elahi E, Asad S, Banat I. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnol Lett*. 2008;30:263-270.

32. Pruthi V, Cameotra S. Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2008;3:452-460.
33. Bryant S, Lockhart T. Reservoir engineering analysis of microbial enhanced oil recovery. *SPE Reservoir Eval Eng*. 2002;5:365-374.
34. Segnini N, Januara M, García A. Growth and starvation of a strain of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Brazilian oil formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005;21:1471-1475.
35. Sanket J, Chirag B, Anjana D. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolated *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*. 2008.
36. Behlulgil K, Mehmetoglu T, Donmez S. Application of microbial enhanced oil recovery technique to a Turkish heavy oil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992;36:833-835.
37. Knapp R, McInerney M, Nagle D, Folmsbee M, Maudgalya. Development of a microbiology enhanced oil recovery process for the Delaware Childers Field, Nowata Country. *Okla. Geol Surv Circ*. 2002;108:193-200.
38. Nazina T, Sokolova D, Grigoryan A, Xue Y, Belyaev S, Ivanov M. Production of oil-releasing compounds by microorganisms from the Daqing oil field, China. *Microbiology*. 2003;72:173-178.
39. Richardson, TX. Tertiary oil recovery with microbial biosurfactant treatment of low-permeability Berea sandstone cores. *SPE 94213*. Society of Petroleum Engineers. 2005.