



Recuperación Mejorada de Petróleo Asistida por Microorganismos con Capacidad de Sintetizar Biosurfactantes

Miguel A. Hernández Rivera¹, Uri M. Ojeda Morales², Arturo Martínez Morales³

¹ División Académica de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Cunduacán, Tab., México

² División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tab., México

³ División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Jalpa de Méndez, Tab., México.

email: miguel.hernandezr@ujat.mx

Resumen

El petróleo es la principal fuente de energía del mundo. Con el tiempo su explotación y producción ha disminuido lo cual promueve la implementación de novedosas técnicas de extracción que incrementen la eficiencia de extracción. La recuperación mejorada de petróleo con ayuda de microorganismos (MEOR), resulta una opción viable para implementarse en pozos maduros o abandonados que mediante el uso de microorganismos y sus productos metabólicos, tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial e interfacial del agua, así como de cambiar la mojabilidad de la roca reservorio que contiene al petróleo residual. La MEOR es una tecnología ambientalmente amigable que permite recuperar porcentajes importantes de hidrocarburos pesados no recuperables por métodos convencionales. El objetivo de este capítulo es describir mediante una revisión bibliográfica la recuperación mejorada de petróleo con ayuda de microorganismos a través de diferentes fuentes de datos.

Palabras Clave: MEOR, petróleo, combustibles, biosurfactantes.

Abstract

Oil is the world's main source of energy. Over time its exploitation and production has decreased, which promotes the implementation of novel extraction techniques that increase extraction efficiency. Improved oil recovery with the help of micro-organisms (MEOR), is a viable option to be implemented in mature or abandoned wells that through the use of micro-organisms and their metabolic products, have the property of decreasing the surface and interfacial tension of the water, as well as changing the wettability of the reservoir rock containing the residual oil. MEOR is an environmentally friendly technology that allows the recovery of important percentages of heavy hydrocarbons not recoverable by conventional methods. The objective of this chapter is to describe improved oil recovery with the help of microorganisms, through different data sources through a bibliographic review.

Key words: MEOR, oil, fuels, biosurfactants.

Recibido: 12 de mayo de 2019. Aceptado: 31 agosto 2019. Publicado: 1 de diciembre de 2019.

1. Introducción

Debido a que el petróleo es la principal fuente de energía y de materias primas para la industria química mundial, las técnicas de exploración y extracción están en constante investigación y optimización. Sin embargo, es importante mencionar que en los últimos años las reservas mundiales de petróleo han disminuido considerablemente, en parte a las elevadas tasas de crecimiento poblacional en el mundo, aunado a las dificultades para encontrar yacimientos nuevos. Adicionalmente, sabemos que en los campos maduros y abandonados alrededor del mundo existen cuantiosas reservas cuya extracción por métodos convencionales no es económicamente atractiva, aunque se estima que globalmente solo ha sido posible extraer alrededor de 1 trillón de barriles de petróleo, quedando sin extraer un excedente calculado entre 2 y 4 trillones de barriles de hidrocarburos, lo que representa, en promedio, cerca del 67% del total de las reservas conocidas de petróleo en el mundo [1].

En general, la producción de petróleo a partir del desarrollo de campos petroleros se constituye de tres etapas: primaria, secundaria y terciaria (o mejorada). En la etapa de extracción primaria, la presión natural del reservorio conduce el petróleo del fondo del pozo productor hacia la superficie, a veces esta etapa se combina con elevación con gas (gas lift) inyectando un gas directamente en la columna de producción con la finalidad de disminuir la densidad del petróleo crudo, y la carga hidrostática en la columna, facilitando su ascenso. También puede emplearse bombeo en la parte superficial del pozo para facilitar el desplazamiento del petróleo. Durante esta etapa solo es posible recuperar alrededor del 10 % del petróleo originalmente en sitio [1, 2].

La producción secundaria se realiza mediante técnicas de recuperación tales como inyección de agua (*water flooding*) o gas al reservorio. Estos fluidos inyectados arrastran el petróleo hacia el pozo productor, recuperando entre el 20 % y el 40 % del petróleo originalmente en sitio, este proceso alarga la vida productiva de un yacimiento. Esta recuperación secundaria no es económicamente atractiva, debido a que el corte de agua representa un porcentaje mayoritario del efluente del pozo. Al final de esta etapa productiva, el petróleo residual en el reservorio representa entre el 80 % y el 60% del petróleo originalmente en sitio, siendo este producto el objetivo de las técnicas empleadas en la tercera etapa. En la tercera etapa, las técnicas empleadas, también llamadas técnicas de recuperación mejorada o técnicas de EOR (Enhanced Oil Recovery, por sus siglas en inglés), pretenden optimizar la eficiencia de producción del aceite original del reservorio (de 30 % a un 60% o más). Después de largos años de aplicación, se reporta que las técnicas mejoradas convencionales han tenido éxito comercial [1, 2] actualmente se clasifican en tres categorías principales:

(a) **Recuperación Térmica:** involucra el suministro de calor al reservorio tal como la inyección de vapor para disminuir la viscosidad y facilitar el desplazamiento de las fracciones más pesadas y altamente viscosas del petróleo. Las técnicas térmicas representan más del 40% de la producción terciaria en Estados Unidos, principalmente en los campos petroleros de California [1].

(b) **Inyección de Gas:** consiste en la inyección de gases que se expanden dentro del reservorio y hacen fluir el petróleo hacia el pozo productor. Generalmente, suele usarse gas natural, nitrógeno o dióxido de carbono, aunque también pueden emplearse gases que se disuelvan en el petróleo (desplazamiento miscible) para disminuir la viscosidad y densidad e incrementar la velocidad de flujo de los hidrocarburos a través del reservorio. Esta estrategia representa cerca del 60% de la producción mejorada en Estados Unidos [1].



(c) **Inyección Química:** esta técnica puede involucrar el uso de macromoléculas o polímeros solubles en agua con la finalidad de incrementar la efectividad de la inundación con agua. Esto ocurre porque la solución agua-polímero posee una viscosidad y densidad mayores a las del agua sola, por lo que el arrastre del petróleo resulta más efectivo. También pueden emplearse sustancias surfactantes que disminuyen la tensión superficial que a menudo mantiene retenido al petróleo en el interior de los poros de la roca, evitando que el petróleo pueda desplazarse con facilidad hacia el pozo productor. Otras aplicaciones incluyen la inyección de sustancias alcalinas (desplazamiento alcalino) o de ácidos (desplazamiento ácido). En general esta técnica es la menos empleada en los países productores de petróleo, posiblemente por los altos costos que implica y por la imprevisibilidad de su eficacia [1].

Entre las técnicas aún en desarrollo que podrían resultar alternativas viables y prometedoras, está la recuperación mejorada conocida como MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery, por sus siglas en inglés) la cuál emplea microorganismos específicos, o bien, sus productos metabólicos.

El objetivo de este capítulo es describir mediante una revisión bibliográfica a través de diferentes fuentes de datos sobre la recuperación mejorada de petróleo con ayuda de microorganismos.

2. Recuperación Mejorada de Petróleo con Microorganismos (MEOR)

2.1 Antecedentes

En 1926 W. J. Beckman concluyó que debido a que la mayor parte del petróleo permanecía atrapado en el reservorio después de las etapas primaria y secundaria, era necesario investigar métodos que permitieran incrementar las reservas de petróleo y el factor de recuperación. La propuesta fundamental de Beckman fue que alimentando un inóculo con bacterias productoras de enzimas y dejándolo en contacto con el petróleo residual en el reservorio, las enzimas producidas por los microorganismos podrían cambiar la viscosidad y la densidad del petróleo y hacerlo fluir de nuevo. Sin embargo durante los años 1926 a 1940 no se llevó a cabo ningún otro adelanto importante en relación con los procesos de recuperación de petróleo que emplearan microorganismos o sus productos metabólicos [3].

Fue hasta 1947 que Zoe Bell evaluó la capacidad de algunos microorganismos de la especie *Desulfovibrio hydrocarbonoclasticus* para liberar hidrocarburos de materiales que simulan la roca reservorio, un hallazgo que le valió la designación de una patente por sus descubrimientos. Del mismo modo, otros investigadores como Updegraff y Wren desarrollaron otra patente con base en sus investigaciones. Ellos, como en el caso anterior, trabajaron también con cepas bacterianas del género *Desulfovibrio*, pero las combinaron con otras cepas (formando lo que en la actualidad se conoce con el nombre de consorcios) y consideraron el uso de nutrientes específicos como melaza y carbohidratos solubles en agua como en el caso del azúcar de caña, con el fin de promover el crecimiento microbiano [3].

Sin embargo, a pesar de estos primeros intentos de recuperación mejorada de petróleo con ayuda de microorganismos, no fue sino hasta mediados de los años 50's, cuando el laboratorio de investigación de Scocony Mobil realizó las primeras pruebas de MEOR en condiciones de campo en el Estado de



Arkansas, Estados Unidos, logrando un éxito parcial. Los análisis finales mostraron una complejidad en cuanto al uso de microorganismos en los procesos de recuperación mejorada de petróleo [3 – 5].

Para finales del siglo XX, la MEOR había sido ya aprobada como un método científico e interdisciplinario que permite la recuperación mejorada de petróleo por muchos científicos que trabajan en los procesos de recuperación y en la biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos [4].

2.2 Componentes y mecanismos del Proceso MEOR

Con el fin de mejorar la recuperación de hidrocarburos se han empleado diferentes sustancias químicas como surfactantes, emulsificantes, polímeros, ácidos, dispersantes y solventes (métodos conocidos como EOR) acoplados a técnicas de recuperación secundaria como la inundación con agua. Sin embargo, estos métodos pueden llevar riesgos ambientales inherentes, ya que muchos contienen sustancias potencialmente tóxicas como el óxido de etileno usado en la producción de surfactantes no iónicos. Debido a esto se han buscado alternativas que sean eco-amigables y que además sean económicamente viables [4].

La MEOR, es una de las técnicas más prometedoras en la recuperación de petróleo sin afectar de forma negativa el medio ambiente y sus ecosistemas. Esta tecnología consiste en la inyección de organismos dentro de un reservorio maduro o agotado, o bien en la estimulación de los microbios ya existentes dentro de él, los cuales deben ser capaces de producir moléculas que modifiquen las propiedades del petróleo (principalmente la fracción pesada) así como las características físicas de la roca y su mojabilidad. La MEOR tiene como principio fundamental promover que las poblaciones microbianas se nutran del petróleo, lo usen como fuente de carbono y lo conviertan en productos con bajo punto de ebullición (como en el caso de las naftas) que pueden actuar como solventes para asistir (a través de la disolución) en la recuperación del petróleo remanente. De esta manera el petróleo es recuperado desde las mismas bases de su formación [5].

La MEOR también abarca la inyección de los bioproductos individuales libres de la biomasa celular, en una especie de caldo que contiene surfactantes de origen microbiológico (biosurfactantes), ácidos, biomasa, emulsificadores, solventes, biopolímeros y gases como CO₂, CH₄, H₂, N₂, lo cual debe aumentar la presión del reservorio y disminuir a su vez la viscosidad del crudo, permitiendo su fluidez y por lo tanto mayor recuperación. Algunas investigaciones indican que la producción de bioproductos microbianos afecta significativamente las propiedades físicas de los reservorios (porosidad, permeabilidad, mojabilidad), así como otras características del fluido (viscosidad y tensión interfacial, principalmente) [6, 7].

La MEOR es una tecnología que puede ser dividida en dos categorías principales.

a) Procesos *in situ*. En ellos se generan biopolímeros y gases por estimulación de diferentes cepas microbianas autóctonas (o nativas) eficientes, en especial bacterias (aunque también suelen usarse hongos filamentosos y levaduras). Esta estimulación se lleva a cabo bajo condiciones de reservorio con el fin de que los biopolímeros producidos sean resistentes a condiciones adversas de temperatura y salinidad [5, 8 - 10].



b) Proceso *ex situ*. Involucran la producción selectiva de bioproductos generados por la actividad metabólica microbiana en condiciones de laboratorio. Los bioproductos extraídos en este proceso y/o caldos, son inyectados dentro del reservorio para lograr una mayor eficiencia en el barrido de los fluidos en un periodo de tiempo más corto que los procesos *in situ*. Estos caldos pueden incluir las células microbianas o carecer de ellas [5, 8 - 10].

Sin embargo, los procesos de MEOR suelen ser variables, lo cual significa que deberían ser estudiados caso por caso, ya que los microbios nativos de cada pozo están adaptados a condiciones muy específicas. Las cepas microbianas, el tipo de crudo y las características físicas del reservorio afectan el proceso de recuperación, produciendo biopolímeros para movilizar el petróleo. Esto quiere decir que los biopolímeros, como los biosurfactantes, que funcionen en una zona en particular no funcionarán en la misma proporción cuando se aplique en otra zona cuyas características geológicas y del petróleo sean diferentes [11].

Pero estos no son los únicos factores que afectan el éxito de los procesos de MEOR, existen otros a considerar para entenderlo de un modo más completo. Por ejemplo, el taponamiento selectivo se relaciona con la obstrucción de uno de los extremos de los poros de la roca reservorio. Cuando procesos de recuperación secundaria como la inundación con agua (water flooding en inglés) están en progreso, los poros más grandes reciben más agua, mientras que el petróleo remanente permanece sin ser extraído en los poros más pequeños. Así, cuando las comunidades bacterianas generan biopolímeros que obstruyen las zonas de mayor permeabilidad, forzan al agua a barrer con el petróleo que se encuentra atrapado en las zonas de menor permeabilidad [12].

Por otro lado, la mojabilidad es otro factor y uno de los que más influye en la distribución del petróleo residual. Al alterarse la mojabilidad se alteran los patrones de flujo ya que ese petróleo que por lo general permanece intacto queda biodisponible para la biodegradación por parte de bacterias y toda su maquinaria metabólica. En los reservorios de areniscas “mojados en agua”, el agua está en contacto con los granos de arena y el petróleo se encuentra en forma de gotitas en el centro de poro, mientras que en los reservorios mojados en aceite, es el petróleo el que está en contacto con la superficie de los granos de arena. [9, 11]. La tabla 1 resume las ventajas y desventajas de la tecnología MEOR.

Ventajas	Desventajas
Económicamente eficiente	Corrosión de los equipos por causas de la actividad de bacterias aeróbicas
Bajo costo de inyección de los microorganismos y de los nutrientes	Aplicación limitada en plataformas mar adentro
Reducción de gastos e instalaciones de bajo nivel de complejidad	Complicaciones en el desarrollo de modelos comprensivos que interpreten todos los aspectos de la tecnología MEOR
Bajo consumo de energía para las actividades metabólicas de los microorganismos	Presencia de microbios con actividad tóxica debido a la existencia de iones de metales pesados específicos
Muy eficiente en yacimientos de naturaleza caliza y carbonatos	Limitaciones de los microorganismos debido a las condiciones de pozo
Mejoramiento de las actividades metabólicas a lo largo del tiempo	
Bajos niveles de contaminación ambiental	



Obtención de mejores resultados debido a la conjugación de mecanismos múltiples en el mismo intervalo de tiempo

La posibilidad de aplicarlo tanto a la fracción ligera como a la fracción pesada del petróleo

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la tecnología MEOR. Fuente: [5].

Los productos microbianos producidos para la MEOR tienen la ventaja de que son biodegradables y de baja toxicidad, además de ser lucrativos y eco-amigables.

Sin embargo, una de las desventajas que se le atribuyen a la MEOR es la percepción negativa del uso de cepas bacterianas y su manejo ante la errónea idea generalizada de que todas las especies bacterianas son peligrosas y causantes de enfermedades y por lo tanto un riesgo para la salud pública. Sin embargo, se han llevado a cabo ensayos en laboratorio en los cuales se ha reportado que los cultivos mezclados de bacterias son seguros para su manejo y no son amenazas para el medio ambiente, plantas, animales o humanos. Y si esto pudiera dejar dudas al respecto hay que tener en cuenta que las condiciones de pozo no son favorables para el crecimiento y desarrollo de organismos patógenos [13].

El éxito de la aplicación de la MEOR necesita tomar en cuenta: a). La presencia de poblaciones bacterianas que sean metabólicamente capaces de sostener un crecimiento biológico apropiado, b). Las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento tales como la presencia de oxígeno u otro tipo de gas que intervenga en la respiración microbiana c). El agua disponible, d). Los requerimientos de nutrientes y contaminantes y e). Verificar los niveles de acidez o alcalinidad [11, 14].

2.3 Microorganismos y la MEOR

Los microbios son organismos unicelulares (a excepción de los hongos filamentosos) que se encuentran en cualquier parte de la biósfera, incluyendo en los yacimientos petroleros, que de acuerdo a sus condiciones particulares se encuentran adaptados. Muchas han sido las cepas microbianas que han sido aisladas en condiciones de pozo, desde las arqueobacterias, hasta organismos más complejos como los hongos. Generalmente se trata de organismos que no reciben la radiación solar requerida y su metabolismo es heterotrófico y, en su mayoría anaerobio, ya que el contenido de oxígeno disminuye con la profundidad [3].

En estas condiciones las fuentes de carbono y electrones básicos para la respiración son importantes. En un yacimiento, el petróleo no es la única fuente de carbono disponible, sino también otros compuestos orgánicos productos de su metabolismo. Estos compuestos pueden ser ácido acético, ácido benzoico, ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiónico, entre otros, mientras que los donadores de electrones los constituyen principalmente moléculas de hidrógeno molecular [5].

Hay que tomar en cuenta que los microorganismos que viven en condiciones de pozo son los que tienen las mejores posibilidades de dar resultados en un proceso de MEOR, que han estado expuestos a diferentes factores que son influenciados de acuerdo a la profundidad del reservorio; por ejemplo, la temperatura puede variar desde los 10° C a una distancia promedio de 27 m, hasta 124° C con un promedio entre 40° y 80° C. Y lo mismo pasa con la salinidad y la presión, las cuales aumentan entre más profundo sea el pozo. Por ejemplo, de acuerdo a algunos datos reportados en la literatura, a una



profundidad de 1000 m, la presión puede alcanzar valores de 11.3 MPa y una salinidad de 7000 mg/L; mientras que a 2200 m la presión alcanza valores de 21 MPa y salinidad de 230 000 mg/L. Claro que estas cantidades son variables porque estos valores no sólo dependen de la profundidad, sino también de la densidad de la roca reservorio. De manera que las mejores cepas (en promedio, ya que no todos los reservorios son tan profundos) son aquellas que son halotolerantes, termofílicas, barofílicas y con un metabolismo anaerobio, de preferencia, ya que el contenido de oxígeno disminuye con el aumento de la profundidad y la presión [5, 15 - 17].

Las condiciones que prevalecen dentro de un yacimiento petrolero son muy diferentes a las que ocurren sobre la superficie. En los reservorios el potencial redox es muy bajo, las temperaturas muy altas y los contenidos de salinidad pueden ser de hasta un 10%. Además, el intercambio de electrones para la respiración es diferente, ya que no existen muchos aceptores de electrones basados en oxígeno y los hidrocarburos del petróleo suelen ser tóxicos para los organismos vivos, sin embargo, los microorganismos que prevalecen en estos ambientes poseen diferentes estrategias de supervivencia y han sido capaces de adaptarse a las condiciones del yacimiento [5].

En general, muchas son las especies de microorganismos que pueden ser útiles en la recuperación de petróleo mediante la utilización de biosurfactantes u otras moléculas propias de su metabolismo, sin embargo son las cepas bacterianas las que son consideradas como las mejores candidatas para un proceso de MEOR, ya que los hongos filamentosos, levaduras, las algas y los protozoarios podrían presentar problemas de taponamiento selectivo de los poros de la roca debido a su tamaño. [13].

Sin embargo, quizás otros microorganismos distintos a las bacterias, como los hongos y los protistas no deban ser descartados completamente para su aplicación con tecnologías MEOR, porque aunque no cuentan con las mismas capacidades adaptativas, debido a su biología más compleja, sí sea factible usar sus metabolitos (crudos o puros) para la recuperación de petróleo. Consideremos que la aplicación de MEOR no es igual en todos los puntos y que no todos los pozos son tan profundos ni tienen la misma geología (algunos son de arenitos, otros de carbonatos). Además, las técnicas *in situ* puede hacer uso de los bioproductos (tales como los biosurfactantes) libres de células, en lo que se ha denominado con el nombre de caldo crudo, ya que en esa solución se encuentran suspendidas diversas biomoléculas que son fundamentales para la recuperación del petróleo en un yacimiento maduro o clausurado.

2.4 Selección de los Microorganismos para MEOR

Se ha dicho que una de las condiciones para que puedan usarse microorganismos en procesos de MEOR es que sean organismos nativos, ya que estos se encuentran adaptados a las condiciones ambientales del yacimiento, sin embargo se ha podido comprobar de la existencia de cepas microbianas que han sido introducidas en los pozos a través del agua que se inyecta durante los procesos de recuperación secundaria (water flooding), de manera que es muy difícil distinguir las bacterias nativas de las que no lo son, sobre todo en las regiones del pozo donde el contenido de salinidad y temperatura son bajas porque estos son ambientes que son favorables para el crecimiento de las cepas no nativas de la superficie [18 – 20].

Es muy probable que el agua que se inyecta en el pozo (una salmuera cuya naturaleza puede ser agua de mar) cambie la geoquímica del yacimiento en forma permanente, como en el caso de las concentraciones de oxígeno y sulfatos que provienen del exterior una vez que se han iniciado las



actividades de perforación. Incluso, aunque no se hayan iniciado procesos de recuperación secundaria a través de un barrido hecho por *water flooding*, existen posibilidades de que organismos del exterior ingresen al yacimiento durante la misma perforación o en la introducción del equipo en la cabeza del pozo. Incluso los daños en las tuberías a través de la fuga de líquidos también son un foco de introducción de organismos no nativos, y aunque la industria utiliza sustancias bactericidas y los microorganismos no sean capaces de crecer con la misma naturaleza, en realidad la microbiota jamás volverá a ser la misma [3, 21].

Para elegir a los organismos correctos en la recuperación mejorada de petróleo se tienen que tomar en cuenta muchos parámetros, ya que las especies seleccionadas no sólo tienen que ser capaces de adaptarse a las condiciones de pozo, ser autóctonas y considerar los mecanismos de respiración de los que disponen (los mejores resultados en la recuperación de petróleo han sido obtenidos con bacterias anaerobias estrictas), sino que también deben ser capaces de producir los bioproductos deseados y en las cantidades necesarias. [21, 22].

Los factores físicos son muy importantes en el correcto funcionamiento fisiológico de los microorganismos. La temperatura, salinidad y presión atmosférica podrían ser considerados factores principales, siendo los demás considerados como factores secundarios.

En el caso de la temperatura, ésta debe ser considerada como el factor más importante en la recuperación de petróleo debido a la influencia que ejerce sobre el crecimiento, sobrevivencia y calidad de los productos metabólicos de los microorganismos inherentes al pozo. Es decir, cuando las temperaturas son bajas, la velocidad de transporte disminuye, mientras que cuando es elevada o por encima de los requerimientos fisiológicos del microorganismo puede ocurrir desnaturalización de la batería metabólica y enzimática. Además, la temperatura también afecta el estado físico de los hidrocarburos del petróleo; por ejemplo, a una temperatura baja la viscosidad aumenta, los alcanos de cadena corta se volatilizan con mayor facilidad y su solubilidad en el agua disminuye [6, 23].

En los pozos profundos las bacterias termofílicas son las más acordes para la recuperación de hidrocarburos ya que tienen una mejor capacidad de respuesta adaptativa para vivir en condiciones extremas. Es por eso que las cepas tienen que tener un rango de adaptación ante las condiciones de pozo que tienden a ser cambiantes dentro del mismo. Pero en los medios con temperaturas superiores a los 60 °C no sólo existen microorganismos termofílicos, sino que también se han hallado otros cuyo rango de temperaturas los ubican dentro de los mesofílicos, pues como se ha dicho con anterioridad, durante la inyección de agua en los procesos de recuperación secundaria muchas bacterias de la superficie se filtran al interior del pozo, y como la temperatura del yacimiento desciende esto hace que esa microbiota mesofílica proliferen. Lo es positivo para la MEOR ya que debido a esto la diversidad microbiana se expande y por lo tanto se tienen más metabolitos activos que se producen con mayor facilidad que si sólo se tuvieran termofílicos [23].

La presión atmosférica también tiene su importancia, ya que cuando la presión hidrostática es elevada, el crecimiento microbiano disminuye, aunque su efecto en la sobrevivencia de las cepas es realmente poco o nulo. Sin embargo, un aumento en la presión sí afecta el potencial redox de los gases que intervienen en la respiración, como el dióxido de carbono, e incrementa su solubilidad, lo cual es resultado de las altas presiones que hay en el interior de un pozo que alcanza profundidades superiores a los 3 000 m [24].



Y en lo que respecta a la salinidad, también tiene un efecto importante en el porcentaje de recuperación de petróleo, y es tan determinante como la temperatura y la presión porque afecta notablemente la reducción de la viscosidad del petróleo. Típicamente una salmuera tiene una concentración que va de 100 mg/L hasta más de 300 g/L, valores que se ven modificados por la profundidad, afectando sensiblemente los resultados de un proceso de MEOR debido a que los microorganismos toleran rangos diferentes de salinidad. Sin embargo, un efecto positivo de las altas concentraciones de salinidad es la reducción de la tensión superficial disminuyendo el nivel de la concentración micelar crítica [5].

Por otro lado, los factores físicos secundarios también tienen su efecto en los microorganismos empleados en la recuperación mejorada de petróleo, como en el caso del pH, el tamaño de poro y la permeabilidad. Por ejemplo, a un tamaño de poro reducido, la permeabilidad también es baja, incidiendo de forma directa sobre el efecto de transporte a través de los capilares [25].

Empero, no sólo hay factores físicos que determinan el desempeño de los microorganismos empleados en la MEOR, también los hay biológicos. Es decir, procesos como el tipo de respiración es de suma importancia sobre sus capacidades metabólicas. La respiración es un mecanismo que tiene como finalidad la producción de energía metabólica de la cual dependen todos los procesos bioquímicos. De modo que basados en esa forma de acción-respiración se pueden clasificar como: organismos metanogénicos, bacterias sulfato reductoras, microorganismos fermentativos, bacterias reductoras de nitratos y bacterias reductoras de hierro [3].

En el caso de las bacterias sulfato-reductoras, estas son capaces de establecer emulsiones estables de petróleo, incluso pueden disminuir la tensión superficial y la tensión interfacial debido a la generación de bioproductos metabólicos como hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos alifáticos [26].

Esta clase de bacterias, las sulfato reductoras, han sido recuperadas de los campos petroleros. Se trata de organismos heterótrofos anaerobios facultativos, es decir, que son capaces de tolerar el oxígeno como agente aceptor de electrones, sin embargo también tienen la capacidad de usar sulfatos para el intercambio de electrones provenientes de compuestos orgánicos o incluso hidrógeno en un proceso de desasimilación típico y generar azufre como compuesto final. Debido a esta actividad son responsables del agrietamiento de las paredes del yacimiento por lo que las hace buenas candidatas para un proceso de MEOR [26].

Las sulfato-reductoras pueden prosperar en un amplio rango de factores: 4-85 °C, 0-17 % de salinidad, 4-9.5 de pH y diferentes niveles de presión, es por eso que son excelentes candidatas para usarse en procesos de MEOR. Algunos ejemplos de géneros bacterias sulfato-reductoras que han sido detectadas en los reservorios de petróleo son: *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Thermodesulfobacteria*, *Nitrospira*, *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*, incluyendo miembros comunes de los géneros: *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfotignum*, *Desulfobotulus*, *Desulfobulbus*, *Desulfacinum*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulforhabdus*, *Desulfatibacillum*, *Desulfoglaeba*, *Desulfonauticus*, *Desulfocurvus* (*Deltaproteobacteria*) *Desulfotomaculum* (*Firmicutes*), *Thermodesulfobacterium* (*Thermodesulfobacteria*), *Thermodesulfovibrio* (*Nitrospira*), *Archaeoglobus* (*Euryarchaeota*) y *Caldivirga* (*Crenarchaeota*) [26, 27].



Pero no sólo las sulfato-reductoras son útiles en la recuperación mejorada de petróleo, también están las bacterias reductoras de nitratos. Estas son especies que, como su nombre lo indica, utilizan nitratos como aceptores de electrones para reducir nitratos a nitritos y después a nitrógeno molecular o amonio. Especies del género *Geobacillus*, clasificadas como bacterias reductoras de nitratos, son miembros muy comunes dentro de los reservorios de petróleo, y algunas especies pertenecientes a este género son capaces de degradar alcanos bajo condiciones aerobias, mientras que algunas podrían reducir nitratos de manera anaeróbica preferentemente. Otros géneros de bacterias nativas reductoras de nitratos como *Deferribacter*, *Sulfurimonas*, *Arcobacter* y *Marinobacter* también han sido halladas dentro de los yacimientos de petróleo [5, 27].

El metabolismo de las cepas microbianas como las arqueobacterias tiende a ser variado sobre todo cuando trabajan en condiciones extremas, las moléculas aceptoras y donadoras de electrones son importantes en la generación de energía metabólica, y en el caso de las matanogénicas no es la excepción. Los grupos principales que forman parte de esta división y que han sido identificadas en los procesos de MEOR son: *Metanobacterales*, *Metanosarcinales*, *Metanomicrobiales* y *Metanoprales*. Estas metanógenas pueden prosperar en un amplio rango de ambientes anaerobios, teniendo rangos de temperatura donde se desarrollan bien que se salen de los límites de los extremófilos, ya que pueden ser mesófilas (Li *et al.*, 2017). Los sustratos más comunes que las metanógenas usan es el acetato de hidrógeno, mientras que otras especies de este grupo también pueden usar metilaminas y metanol con el fin de producir metano, como es el caso de *Methanohalophilus euhalobius*, *Methanosarcina mazi* y *Methanosarcina siciliae* [28].

Los microorganismos metanogénicos son importantes en la MEOR ya que producen biogás que levanta la presión del pozo y permite que la recuperación de los hidrocarburos se lleve a cabo [28].

Los microorganismos fermentadores también forman parte de la microbiota nativa de un yacimiento petrolero (ver tabla 2). Estos se caracterizan por ser capaces de usar compuestos orgánicos como aceptores y donadores de electrones, generando como productos derivados de su metabolismo moléculas típicas como acetato, dióxido de carbono, formiato y lactato, incluso algunas son capaces de reducir nitratos y degradar hidrocarburos. Como se mencionó antes, el dióxido de carbono represuriza el reservorio permitiendo que el petróleo pueda ser recuperado. Algunos géneros y especies de bacterias fermentadoras termofílicas incluyen: *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldanaerobacter*, *Thermotoga*, *Thermosipho* y *Getoga*. Mientras que otras especies halofílicas identificadas en el interior de los yacimientos incluyen: *Anaerobaculum thermoterrenum*, *Thermovirga lienii* y *Acetobacterium romashkovi* [23].

En la literatura se han mencionado diversos trabajos donde se han empleado bacterias cuyos metabolitos permiten hacer que el petróleo atrapado dentro de los capilares de la roca de formación sean biodisponibles [6, 7, 9, 10], ya sea fracturando la estructura de los agregados por medio de ácidos o solventes, cambiando la mojabilidad de la roca, lo mismo que rompiendo la tensión interfacial entre el agua y el petróleo remanente, todo lo cual permite el flujo de petróleo crudo adicional, mejorando su recuperación. En la Tabla 2 se muestra algunas cepas microbianas que son de uso común en la producción de biosurfactantes y para su uso en la MEOR.



Organismos	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i> BAS50	[29]
<i>B. licheniformis</i> JF-2	
<i>B. pumilis</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Arthrobacter</i> sp	
<i>Geobacillus pallidus</i>	[30]
<i>Enterobacter cloacae</i>	[31]
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	[16]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	
<i>Thermoanaerobacter finii</i>	
<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	
<i>Bacillus mojavenensis</i> (PTCC 1696)	[32]
<i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Bacillus stearothermophilus</i> SUCPM#14	[33]
<i>Bacillus subtilis</i> B20	[34]
<i>B. licheniformis</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	[35]
<i>Bacillus subtilis</i> B30	[10]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ,	[36]
<i>Clostridium tyrobutiricum</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	
<i>Cunninghamella echinulata</i>	[37]
<i>Acinetobacter baylyi</i> Zj2	[38]
<i>Rhodococcus</i> sp	[39]
<i>Starmerella bombicola</i>	[40]
<i>Thermoshipo</i> , <i>Geotoga</i> , <i>Thermotoga</i> , <i>Garciella nitratireducens</i> ,	[41]
<i>Petrotoga mexicana</i> , <i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	
<i>Bacillus mojavenensis</i> JF-2	[42]
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	[43]
<i>Pseudomona cepacia</i>	[19]
<i>Bacillus</i> (SLDB1	[18, 44 - 46]
<i>Bacillus</i> (SB2)	
<i>Bacillus</i> sp. I-15	
<i>B. pumilis</i> 2IR	
<i>Aspergillus</i> sp	[14]

Tabla 2. Organismos reportados en la literatura en la MEOR.

2.5 Nutrientes en la producción de bioproductos para MEOR

La elección correcta de los microorganismos empleados en la recuperación mejorada de petróleo es importante, sin embargo también lo es la elección de los nutrientes que se deben agregar para que exista un crecimiento óptimo microbiano. El hecho de tener los nutrientes apropiados es un parámetro clave en la generación de los bioproductos necesarios para una correcta recuperación de petróleo. Algunos que se han propuestos específicamente en la MEOR han sido melaza, petróleo crudo, mezclas de melaza y nitrógeno, así como sales de fósforo. De hecho, Las materias primas como la glicerina residual y residuos de aceites vegetales, podrían ser viables para la producción de biosurfactantes, en función de las altas concentraciones que se obtienen [47]. En la tabla 3 se muestran

algunas aplicaciones de MEOR y el tipo de nutrientes utilizados para la recuperación de hidrocarburos.

Una forma de abaratar los precios en la generación de biosurfactantes y otros bioproductos es usando desechos agroindustriales dado el hecho de que son de muy bajo costo. Se pueden emplear diversos cultivos cíclicos como maíz, frijol, sorgo, soya, cacahuete, ajonjolí; y cultivos perennes como café, cacao, caña de azúcar, mango, plátano y palma de aceite [47].

País	Sistema microbiano	Nutrientes	Efectos
USA	Sistemas mezclados de Clostridium sp, Bacillus sp, B. licheniformis y cepas Gram negativas	Melaza al 4 %	Producción mejorada de petróleo superior al 79 %
USA	Bacterias aerobias y anaerobias facultativas en un medio fermentativo de melaza-sacarosa	Sacarosa, melaza, sales de fosfato, sales de nitrato, extracto de levadura	Incremento significativo en la producción de petróleo
USA	Desulfovibrio y	Lactato de Ca o Na, ácido ascórbico, extracto de levadura, K ₂ PO ₄ , NaCl,	Incremento en la tasa de producción de petróleo del 66 %,
USA	Cultivo líquido de una muestra de microorganismos marinos	Solución salina de nutrientes para controlar la deposición de parafinas	Incremento en la producción del petróleo en un 166 % por tres meses
Rusia	Bacterias aerobias y anaerobias provenientes de lodos activados	Aguas de desechos con la adición de algunos bioestimulantes y aditivos químicos	Recuperación adicional de 1000 a 2000 t/año de cada uno de los 600 pozos tratados
Rusia	Bacterias aerobias y anaerobias como bacterias reductoras de sulfatos, desnitrificantes, fermentativas y digestoras de celulosa	Biomasa proveniente de turba rica en limo en sustratos hidrolizables	Incremento en la producción de petróleo desde 180 hasta 200-300 t de petróleo por día
Rusia	Mezcla de bacterias aerobias y anaerobias	Melaza al 4 %	Incremento en la producción de petróleo en un 8% por espacio de 4 meses
Rumania	Mezclas de cultivos enriquecidos, adaptados con predominio de cepas de los géneros Clostridium, Bacillus y otras bacterias Gram negativas	Melaza del 2 % al 4 %	Aumento en la producción de petróleo superior al 200 % en dos pozos por espacio de 2 a 4 años
Argentina	Microorganismos anaerobios facultativos degradadores de hidrocarburos	Nutrición a partir de hidrocarburos lineales	Mejoramiento en la producción de petróleo entre un 25.8 % a 110 %

Tabla 3. Aplicaciones de la MEOR y los tipos de nutrientes utilizados. Fuente: Adaptado de: [5].



2.6 Productos Metabólicos (bioproductos) útiles para la MEOR

La recuperación mejorada de petróleo con ayuda de microorganismos no sólo hace uso de las células totales, sino también emplea los productos derivados de su actividad metabólica. Se trata en esencia de moléculas específicas que tienen un efecto directo e importante en la recuperación del petróleo. Las moléculas individuales que más se emplean son los biosurfactantes.

Como tal son metabolitos secundarios producidos por diversidad de microorganismos, durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano. Muchos de los biosurfactantes se producen cuando se ponen en contacto con sustancias que son insolubles en agua, como los hidrocarburos líquidos y sólidos. Realmente los biosurfactantes son altamente variables en su estructura, lo cual se debe al uso de diferentes fuentes de carbono derivadas de sustratos renovables, así como al uso de diferentes parámetros de cultivo como temperatura, salinidad, pH, tiempo de incubación, el medio y los nutrientes que se usan para enriquecerlos [48].

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas de superficie activas capaces de reducir la tensión superficial e interfacial entre el agua y el petróleo, aumentando su movilidad. Son además sustancias menos tóxicas que los surfactantes químicos, son biodegradables y son estables a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad. Sin embargo no son las únicas moléculas que intervienen en los procesos de recuperación [25].

Cuando un microorganismo, por ejemplo alguna cepa bacteriana, nativo de un reservorio se pone en contacto con las diferentes fracciones del petróleo produce una serie de moléculas que son capaces de promover la formación de emulsiones entre los hidrocarburos y el agua circundante, ya sea esta natural al pozo o de la que ha sido inyectada dentro a través del proceso de *water flooding*. De entre esas moléculas, ciertamente los biosurfactantes son los más estudiados (como se mencionara líneas antes) por la capacidad de romper la tensión superficial del agua de 72 mN/m a valores que pueden llegar hasta 30 mN/m o poco menos, lo cual los hace muy atractivos para su uso en la MEOR [25].

En la actualidad, la producción de biosurfactantes ha alcanzado altos costos debido los altos porcentajes de purificación a los que son sometidos, principalmente porque los biosurfactantes también son usados con fines biomédicos, no obstante, cuando las cepas microbianas son usadas en procesos de MEOR, producen en condiciones naturales no sólo biosurfactantes, sino también ácidos, solventes, polímeros y gases que aunque no tienen las mismas propiedades de los biosurfactantes contribuyen cada una con sus propiedades y efectos sobre el petróleo y la roca reservorio. Todos esos bioproductos forman ese caldo crudo, el cual en vez de purificarse en un proceso de MEOR, ya que no será aplicado en personas o animales, debería usarse tal cual, disminuyendo considerablemente los costos porque ya no sólo se trata de biosurfactantes sino de un conjunto de productos metabólicos que actúan juntos en una sinergia que incide directamente en los porcentajes de recuperación de petróleo [19]. Esa cantidad recuperada dependerá de la diversidad molecular del caldo crudo, lo cual a su vez depende de la cepa, el tipo de petróleo, las condiciones geoquímicas del yacimiento, los nutrientes de los que dispone, la capacidad de establecer consorcios no sólo entre bacterias sino también entre cepas microbianas más complejas como los mohos filamentosos y las levaduras [3].

Los biosurfactantes son parte de esos bioproductos que constituyen el caldo crudo, por ser los más frecuentes reportados en las investigaciones y ensayos de MEOR. Los surfactantes tienen una característica estructural que consiste en la presencia de grupos funcionales que tienen muy poca

atracción por el solvente, conocido como grupo liofóbico, y grupos que tienen una atracción muy fuerte por el solvente, llamado grupo liofílico, estructura conocida como anfipática. Sin embargo, también presentan estructuras complejas basadas en azúcares, grupos cortos de aminoácidos, cadenas de lípidos o de lipoproteínas. Entonces con base en estas diferencias pueden tener diferentes subdivisiones o clasificaciones [49]. La Tabla 4 muestra una clasificación general de los biosurfactantes. De acuerdo a la presencia de los grupos funcionales que los constituyen se pueden tener clasificaciones generales.

Grupo Mayor	Nombre comercial	Organismo típico
Glucolípido	Rhaomnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i> <i>C. apicola</i>
	Trehalolípidos	<i>Rhodococci</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> y <i>Corynebacterium</i>
	Manosil eritritol lípidos	Son BSF típicos de <i>Pseuzyma</i> y <i>Ustilago</i>
Lipopéptidos y lipoproteínas	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Polimixina	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (PMX B B ₁ y B ₂), <i>P. polymyxa</i> y <i>Paenibacillus amylolyticus</i>
Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros	Lichenisina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N y <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Biosurfactantes poliméricos	Emulsan Liposan
Vesículas extracelulares		<i>Acinetobacter</i> sp <i>Pseudomonas marginalis</i>
Células microbianas totales		Algunas especies de Cianobacterias

Tabla 4. Clasificación general de los biosurfactantes. Fuente: [50].

También se les puede clasificar con base en el peso molecular del biosurfactante. Así, los compuestos de bajo peso molecular disminuyen la tensión superficial e interfacial, y los polímeros de alto peso molecular son en su mayoría agentes estabilizantes. Los glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos constituyen la mayoría de los biosurfactantes de baja masa, mientras que los surfactantes poliméricos, las vesículas y las células microbianas totales se agrupan entre los biosurfactantes de alto peso molecular [3, 51].

En el caso de los biopolímeros, estos son moléculas constituidas principalmente por exopolisacáridos que actúan como un sistema de adhesión que mantiene unido el sistema microbiano a las paredes de la roca, previniendo la desecación y la depredación por parte de otros microorganismos. Tales biopolímeros por su naturaleza viscosa pueden usarse para el taponamiento selectivo de los capilares de la roca modificando el perfil de permeabilidad dentro del reservorio. Del mismo modo tienen el potencial de controlar la movilidad incrementando la viscosidad del fluido desplazante, en este caso el agua, mejorando así la tasa de movilidad y la eficiencia del barrido. Algunos ejemplos de esos biopolímeros son las gomas de xantano producidas por cepas de *Xanthomonas*, gomas de Levan propias de especies bacterianas como *Bacillus*, Scleroglucano de las cepas de *Sclerotium*, entre otros [3, 52]. En la tabla 5 se muestran algunos bioproductos y los microorganismos típicos de los cuales provienen.



Las gomas de Xantano han sido ampliamente estudiadas y debido a sus propiedades físicas de viscosidad y su tolerancia a niveles extremos de salinidad y temperatura son moléculas que bien pueden emplearse en proceso de recuperación mejorada de petróleo con microorganismos.

Producto metabólico	Ejemplo	Microorganismo	Aplicación en MEOR
Gases	CO ₂ and CH ₄	<i>Clostridium</i> sp., <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Methanobacterium</i> sp.	Incremento de la presión, barrido de petróleo, reducción de la tensión Interfacial, reducción de la viscosidad, incremento de la permeabilidad
Ácidos	Acético, butírico, láctico	<i>Clostridium</i> sp., <i>Enterobacter Aerogenes</i>	Incremento de la permeabilidad, emulsificación
Solventes	Etanol, butanol, acetona	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	Emulsificación, reducción de la viscosidad
Polímeros	Polisacáridos, proteínas	<i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Brevibacterium viscogenes</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	Control de la movilidad, reducción de la viscosidad
Bioemulsificantes	Heteropolisacáridos y proteínas	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	Emulsificación, reducción de la tensión interfacial, Control de parafinas, alteración de la viscosidad, producción de metano
Biosurfactantes	Glicolípidos y lipopéptidos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Emulsificación, reducción de la tensión superficial e Interfacial, reducción de la viscosidad
Biomasa	células microbianas	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>	Modificación microbiana del perfil de permeabilidad, taponamiento selectivo, reducción de la viscosidad, degradación de petróleo, alteración de la mojabilidad

Tabla 5. Bioproductos, microorganismos y su aplicación en la MEOR. Fuente: [11, 52, 53].

Con el suministro de nutrientes a microorganismos ya sea inyectados o exógenos, el fluido inyectado (incluyendo los microorganismos y/o nutrientes) tiende a fluir por los caminos más permeables. Los nutrientes proporcionados estimulan a los microorganismos a crecer y esto disminuye la permeabilidad de región y por consiguiente modifica el perfil de la permeabilidad. Es probable que la producción *in situ* de biopolímeros obstruya los poros útiles y en consecuencia da lugar a daños en la formación. Al igual que en el caso de los biosurfactantes, un indicio de la generación de bioemulsificantes es la alteración de algunas características del petróleo crudo, tales como viscosidad, turbidez y punto de fluidez [52].

Otro constituyente del caldo crudo producido por las cepas microbianas cuando están en contacto con hidrocarburos es la generación de bioácidos. Estos, debido a su naturaleza corrosiva disuelven las rocas de carbonatos (así como las calizas que han sido cementadas por carbonatos minerales) y por lo tanto contribuyen al aumento de la permeabilidad, la cual conduce al mejoramiento de la migración del petróleo dentro de los capilares de la roca. Además, los bioácidos generan gases que mejoran el



desplazamiento reduciendo la viscosidad junto a otros efectos colaterales como una eficiencia de barrido más alta [3].

Los principales bioácidos que se producen de acuerdo al metabolismo de bacterias anaerobias fermentativas son ácido acético, láctico y butírico. La producción de estos ácidos orgánicos es una fase normal de la fermentación de los azúcares. Por ejemplo, especies del género *Clostridium* pueden producir 0.0034 moles de ácido por Kg de melaza. Algunas especies del género *Bacillus* también son típicos productores de estos metabolitos [52, 53].

Los microorganismos que se desarrollan en lo profundo de los reservorios de petróleo están adaptados para obtener energía de los sistemas de los que disponen. Tal es el caso de aquellos durante su metabolismo producen gases (comúnmente llamado biogás por el hecho de es producto de la actividad metabólica de las cepas microbianas). Éstas cepas producen H_2 , H_2S , N_2 , CH_4 y CO_2 a través de procesos fermentativos de los carbohidratos que se tienen disponibles, sin embargo, estos productos son consumidos rápidamente por la actividad de otros microbios como en el caso de las arqueobacterias y bacterias metanogénicas, las sulfato-reductoras, las homoacetogénicas y las reductoras de nitratos, que reducen el CO_2 a CH_4 , sulfatos a azufre, CO_2 a ácido acético y nitratos a N_2 , respectivamente [3, 52, 54].

La generación de biogás tiene como consecuencia directa la represurización de yacimiento, que si bien no es la misma presión que al inicio de la explotación del pozo permite que el petróleo que se encuentra atrapado en los poros de la roca fluya hacia el exterior, permitiendo un porcentaje de recuperación que va en función del volumen de gas producido. Por esta razón la producción de biogás es considerado un factor importante en la MEOR [3].

Algunos efectos de los biogases son reducción de la viscosidad, represurización del yacimiento, buen barrido del petróleo, alteración del pH del agua de formación, alteración de la tensión Interfacial, incremento de la permeabilidad por causas de la ruptura de las rocas de carbonatos, taponamiento de los poros por precipitación de minerales orgánicos tales como el carbonato de calcio y cambio en el punto de fluidez del petróleo [3].

Los procesos de recuperación no son completamente puros, es decir, que durante la recuperación *per se* también existe el consumo del hidrocarburo por las especies que forman parte del ecosistema microbiano. Puede ocurrir una oxidación parcial de hidrocarburos a biosolventes tales como como alcoholes, aldehídos y ácidos grasos. Y al igual a como sucede con los bioácidos, los biosolventes tienen la capacidad de disolver parte de la roca reservorio y, en consecuencia, mejorar la permeabilidad del yacimiento. y porosidad. Pero además de eso mejora la permeabilidad. Los biosolventes pueden reducir La viscosidad del aceite a través de la disolución de asfaltenos y componentes pesados existentes en el aceite [55].

Pero además de esto, los biosolventes tienen la capacidad de funcionar con algunas de las propiedades de los biosurfactantes, ya que al igual que estos también pueden reducir la tensión interfacial entre el sistema agua/aceite y el petróleo; incluso su actividad puede alterar la mojabilidad de la roca reservorio. Debido a esto, también son considerados buenos candidatos para ser empleados en la recuperación mejorada de petróleo con microorganismos. Ejemplos de buenos biosolventes son metanol, etanol, 1-propanol, propan-2-diol, 1-butanol, ácidos grasos volátiles y cetonas como la propanona (acetona) y butanona. Algunas bacterias generadoras de biosolventes importantes



reportadas son *Zymomonas mobilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Klebsiella*, *Arthrobacter* y *C. pasteurianum* [5, 11].

Los nutrientes proporcionados estimulan el crecimiento de los microorganismos, lo que disminuye y modifica el perfil de permeabilidad. La biomasa se acumula en las zonas altamente permeables, denominadas zonas de ladrón, y luego desvían la inyección de agua a la zona de transporte de petróleo. Cuando los microorganismos crecen dentro del reservorio, las moléculas en sus superficies las mantienen unidas a los sustratos cerca de donde se alimentan. Como resultado, se crea una biopelícula que evita que el aceite se arrastre hacia las zonas porosas. Las biopelículas pueden definirse como las poblaciones de células bacterianas unidas a una superficie encerrada en una matriz polimérica orgánica. La biomasa desplaza al petróleo conforme va creciendo. Teniendo en cuenta la eficiencia del barrido microscópico, el crecimiento de la biomasa en los poros grandes desvía el flujo de fluido a los poros más pequeños porque los poros grandes reciben la mayoría de los nutrientes [3, 54].

Y tal como sucede con los biosolventes, la biomasa (que se relaciona con los biosurfactantes poliméricos) puede actuar de forma similar a como actúan los biosurfactantes al alterar las características físicas del yacimiento, alterando la mojabilidad de la roca, lo cual tiene su efecto directo en el porcentaje de recuperación de petróleo [54].

Finalmente se encuentran los bioemulsificantes los cuales se encuentran mayormente asociados a los biosurfactantes. Los bioemulsionantes son moléculas anfifílicas de alto peso molecular, cuya función es establecer una emulsión estable con hidrocarburos, generalmente como la forma de aceite en agua. Su principal efecto es sobre la tensión interfacial, lo cual permite la formación de emulsiones entre el agua y el petróleo, mejorando la fluidez de la mezcla y proporcionando mayor capacidad de recuperación. Mientras tanto, los biosurfactantes rompen la tensión superficial entre una fase líquida y otra gaseosa. Para el caso de la MEOR las alteraciones a la tensión interfacial son de mayor importancia por el hecho del mejoramiento de la fluidez de la emulsión arrastra al hidrocarburo fuera de los capilares de la roca [3].

Los biosurfactantes de alto peso molecular, es decir, los bioemulsionantes, no reducen la tensión superficial de un modo significativo, a pesar de su naturaleza anfipática, pero son adecuadamente efectivos en bajas concentraciones al igual que los biosurfactantes de bajo peso molecular. El bioemulsificador más común es el emulsano, que es un heteropolisacárido aniónico y un complejo de proteínas [3].

Los bioproductos no actúan por separado, ni tampoco se garantiza que estén presentes todos los que se han mencionado en este estudio, porque la presencia de ellos es multifactorial, sin embargo cuando se hallan presentes tienen un efecto diferente que cuando sólo se usa una parte de ellos, debido al efecto combinado de cada una de las propiedades que presentan. Su funcionamiento dependerá de las condiciones a las que sean expuestos ya que cada proceso MEOR es diferente entre los campos petroleros, e incluso entre los pozos de cada campo [3].

3. Aplicaciones del Proceso MEOR

Como se ha dicho anteriormente, los procesos de MEOR dependen de muchos factores, y no todos tienen éxito cuando se aplican en condiciones de campo. La tabla 6 muestra algunas aplicaciones *in situ* de la recuperación mejorada de microorganismos en condiciones naturales de yacimiento.

Propiedad	Litología	Rango	Número de pruebas	No. de pruebas exitosas	No. de pruebas fallidas		
Permeabilidad	- Piedra caliza	1 – 10	0	0	1		
		10 – 75	7	6	1		
		75 – 1000	53	41	12		
		1000 – 10000	2	1	1		
	- Carbonatos	1 – 10	2	2	0		
		10 – 75	1	1	0		
Temperatura (°F)	- Piedra caliza/ Carbonatos	75 – 1000	1	1	0		
		1000 – 10000	0	0	0		
		50 – 200	66	48	18		
		>200	0	0	0		
		Salinidad (ppm)	- Piedra caliza/ Carbonatos	<1000	0	0	0
				1000 – 10000	14	13	1
Tipo de mecanismo de recuperación	- Piedra caliza/ Carbonatos	>10000	12	6	6		
		–	34	29	5		
Tipo de prueba de campo	- Piedra caliza	–	314	300	14		
	- Carbonatos	–	89	88	1		

Tabla 6. Número de ensayos de MEOR en campo. Fuente: [5].

Aunque los resultados no deben generalizarse, positivos o negativos, nos dan una idea importante de su aplicación en las condiciones particulares de cada lugar.

4. Conclusiones

La producción de petróleo en la actualidad ha declinado a nivel mundial, lo cual es de importancia ante el hecho de que se trata de la principal fuente de energía, como combustibles, y en la producción de artículos como plásticos, aceites y algunos derivados alimenticios. Por esta razón es importante contar con estrategias que permitan extraer de forma más eficiente el petróleo de los yacimientos.

De un pozo de petróleo en producción sólo se puede extraer hasta un 66% en condiciones óptimas, pero sólo una proporción entre 10-15 % se puede extraer con ayuda de la energía natural del pozo, por lo que el resto tiene que recuperado con ayuda de bombeo o por medio de la inyección de agua y diferentes polímeros que por lo común se convierten en agentes contaminantes.

Ante la necesidad de mejorar la producción pero impactar lo menos posible los ecosistemas naturales, se han propuesto otros métodos menos invasivos. Tal es el caso de la recuperación mejorada de petróleo con ayuda de microorganismos (MEOR), la cual usa los metabolitos (como los biosurfactantes, que son los más estudiados a la fecha) producidos por microorganismos como las bacterias, principalmente, y hongos.



Los metabolitos pueden ser empleados en su forma purificada (como en la caso de los biosurfactantes), sin embargo, los altos costos de purificación hacen esta tecnología sea por el momentos más cara que los polímeros sintéticos que se usan en la recuperación terciaria. Por esta razón, el uso la forma impura de los metabolitos microbianos, también llamado caldo crudo, bajaría sensiblemente los costos (hasta un 60%) ya que ese caldo no sólo lleva biosurfactantes sino también biopolímeros (polisacáridos, proteínas), biogás (CO₂, CH₄), biosolventes (etanol, butanol), bioemulsificantes (heteropoliscáridos, proteínas), biomasa (células totales) que en conjunto mejoran la eficiencia de barrido en el momento de la recuperación del petróleo.

Los mejores microorganismos para la tecnología MEOR son los nativos de cada pozo o cada campo petrolero, ya que el petróleo original en el lugar está estrechamente relacionado con los microbios que coexisten en ese microecosistema, así como de la geología del yacimiento; por lo tanto usar metabolitos como biosurfactantes producidos en otras regiones petroleras no garantizan un alto porcentaje de recuperación (10, 15 – 20 % del petróleo original en el lugar). La identificación de microorganismos locales es de vital importancia para eficientar la recuperación.

Sin embargo, la recuperación aún con los microorganismos nativos depende de que diferentes características como temperatura, presión, pH, salinidad, minerales del suelo, respiración se cumplan de acuerdo a sus necesidades metabólicas. Los efectos de la MEOR tienen que ser evaluada caso por caso.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, específicamente a la División Académica de Ciencias Básicas, por la oportunidad brindada en la publicación de este número.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Satter, A. and G. M. Iqbal. 2016. Cap 17. Enhanced oil recovery processes: thermal, chemical, and miscible floods. Reservoir Engineering, The Fundamentals, Simulation, and Management of Conventional and Unconventional Recoveries.
- [2] Sarafzadeh, P., A. Niazi, V. Oboodi, M. Ravanbakhsh, A. Zeinolabedini H., S. Shahab A., S. Raeissi. 2014. Investigating the efficiency of MEOR processes using *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stearothermophilus* SUCPM#14 (biosurfactant-producing strains) in carbonated reservoirs. Journal of Petroleum Science and Engineering. 113:46–53.
- [3] Tatar, A. 2018. Microbial Enhanced Oil Recovery: Microbiology and Fundamentals, Chapter Ten. Fundamentals of Enhanced Oil and Gas Recovery from Conventional and Unconventional Reservoirs. Gulf Professional Publishing. Australia. Pages 291-508.
- [4] Patel, J., S. Borgohain, M. Kumar, V. Rangarajan, P. Somasundaran and R. Sen. 2015. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 52:1539–1558.
- [5] Safdel, M., M. Amin Anbaz, A. Daryasafar and M. Jamialahmadi. 2017. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. Renewable and Sustainable Energy Reviews 74:159–172.
- [6] Varjani, S. J. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology 223:277–286
- [7] Zhao, F., R. Shi, Q. Cui, S. Han, H. Dong and Y. Zhang. 2017. Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing bacteria for microbial enhanced oil recovery. Journal of Petroleum Science and Engineering 157 (2017) 124–130.
- [8] Al-Wahaibi, Y., S. Joshi, S. Al-Bahry, A. Elshafie, A. Al-Bemani y B. Shibulal. 2014. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 114:324– 333.
- [9] El-Sheshtawy, H. S., I. Aiad, M.E. Osman, A.A. Abo-ELnasr and A.S. Kobisy. 2015. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. Egyptian Journal of Petroleum. 24:155–162.
- [10] Sarafzadeh, P., A. Niazi, V. Oboodi, M. Ravanbakhsh, A. Zeinolabedini H., S. Shahab A., S. Raeissi. 2014. Investigating the efficiency of MEOR processes using *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stearothermophilus* SUCPM#14 (biosurfactant-producing strains) in carbonated reservoirs. Journal of Petroleum Science and Engineering. 113:46–53.
- [11] Speight, J. 2016. Introduction to enhanced recovery methods for heavy oil and tar sands. Part I. Reservoirs and Reservoir Fluids. Second Edition. U.S.A.



- [12] Amato, M., L. Fantacci and J. G. Speight. 2015. An Introduction to Petroleum Technology, Economics, and Politics. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- [13] Van Hamme, J., A. Singh and O. P. Ward. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4):503-549.
- [14] Gao, H., H. Lai, J. Zhang and Q. Xue. 2017. Effects of bacterial cell density and alternating microbial- and enzymolysis-enhanced oil recovery on oil displacement efficiency. *Chemical Engineering Journal*. 327:28–38.
- [15] Kivistö, V. P. K, and M. T. Karp. 2011. Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *Journal of Biotechnology* 152:114–124.
- [16] Castorena-Cortés G., I. Zapata-Peñasco, T. Roldán-Carrillo, J. Reyes-Avila, M. Mayol-Castillo, S. Román-Vargas and P. Olgún-Lora. 2012. Evaluation of indigenous anaerobic microorganisms from Mexican carbonate reservoirs with potential MEOR application. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 81:86–93.
- [17] Bachmann, R. T., A. Clemensis J. and R. G.J. Edyvean. 2014. Biotechnology in the petroleum industry: An overview *International Biodeterioration & Biodegradation*. 86:225-237.
- [18] Joy, S., P. K. S. M. Rahman and S. Sharma. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal* 317:232–241
- [19] Soares da Silva, R. D. C., D. G. Alemida, H. M. Meira, E. J. Silva, C. B. B. Farías, R. D. Rufino, J. M. Luna and L. A. Sarubbo. 2017. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry.
- [20] Shibulal, B., S. N. Al-Bahry, Y. M. Al-Wahaibi, A. E. Elshafie, A. S. Al-Bemani and S. J. Joshi. 2014. Microbial Enhanced Heavy Oil Recovery by the Aid of Inhabitant Spore-Forming Bacteria: An Insight Review. *The Scientific World Journal*. Volume 2014, Article ID 309159. 1-12.
- [21] Wolicka, D. and A. Borkowski. 2012. *Microorganisms and Crude Oil, Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites*. Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.), ISBN: 978-953-51-0629-6, InTec. Poland. 318 p.
- [22] Gudiña, E. J., J. F. B. Pereira, L. R. Rodrigues, J. A. P. Coutinho and J. A. Teixeira. 2012. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial enhanced oil recovery, *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 68:56-64.
- [23] Lin, J., Hao, B., Cao, G., Wang, J., Feng, Y., Tan, X., Wang, W., 2014. A study on the microbial community structure in oil reservoirs developed by water flooding. *J. Petroleum Sci. Eng.* 122, 354-359.



- [24] Saikia, U., Bharanidharan. R., E. Vendhan, K. Y. Santosh and S. Shankar S. 2013. A Brief review on the science, mechanism and environmental constraints of microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *ChemTech*. 5(3):1205–12.
- [25] Varjani, S. J. and V. N. Upasani. 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology* 232:389–397.
- [26] Frank, Y., Banks, D., Avakian, M., Antsiferov, D., Kadychagov, P., Karnachuk, O., 2016. Firmicutes is an important component of microbial communities in water injected and pristine oil reservoirs, western Siberia, Russia. *Geomicrobiol. J.* 33:387-400.
- [27] Li, X.-X., S. M. Mbadinga, J.-F. Liu, L. Zhou, S.-Z. Yang, J.-D. Gu and B.-Z. Mu. 2017. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120:170-185.
- [28] Xue, Y. and G. Voordouw. 2015. Control of Microbial Sulfide Production with Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating. *Frontiers in Microbiology*. 6:1-11.
- [29] Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray and H. L. Fredrickson. 1995. Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5):1706–1713.
- [30] Zheng, C., M. Wang, Y. Wang and Z. Huang. 2011. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. *Bioresource Technology*. 110:338–342
- [31] Darvishi, P., S. Ayatollahi, D. Mowla y A. Niazi. 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84:292–300.
- [32] Ghojavand, H., F. Vahabzadeh and A. Khodabandeh Shahraki. 2012. Enhanced oil recovery from low permeability dolomite cores using biosurfactant produced by a *Bacillus mojavensis* (PTCC 1696) isolated from Masjed-I Soleyman field. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 81:24–30.
- [33] Sarafzadeh, P., A. Zeinolabedini H., M. Ravanbakhsh, A. Niazi and S. Ayatollahi. 2013. Investigating the efficiency of MEOR processes using *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stearothermophilus* SUCPM#14 (biosurfactant-producing strains) in carbonated reservoirs. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 113:46–53.
- [34] Al-Bahry, S.N., Y.M. Al-Wahaibi, A.E. Elshafie, A.S. Al-Bemani, S.J. Joshi, H.S. Al-Makhmari, H.S. and Al-Sulaimani. 2013. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation* 81:141-146.



- [35] Pereira, J. F.B., E. J. Gudiña, R. Costa, R. Vitorino, J. A. Teixeira, J. A. P. Coutinho and L. R. Rodrigues. 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111: 259–268.
- [36] Arora, P., D. R. Ranade and P. K. Dhakephalkar. 2014. Development of a microbial process for the recovery of petroleum oil from depleted reservoirs at 91–96° C. *Bioresource Technology* 165:274–278.
- [37] Andrade, S. N. R., M. A. C. Luna, A. L. C. M. A. Santiago, L. O. Franco, G. K. B. Silva, P. M. de Souza, K. Okada, C. D. C. Albuquerque, C. A. Alves da Silva and G. M. Campos-Takaki. 2014. [35] Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15377-15395.
- [38] Zoua, C., M. Wang, Y. Xing, G. Lan, T. Ge, X. Yan, T. Gu.. 2014. Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochemical Engineering Journal.* 90:49–58.
- [39] Inès, M. and G. Dhouha. 2015. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate Research.* 416:59–69-.
- [40] Konishi, M., Y. Yoshida and J. Horiuchi. 2015. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 119(3):317-322.
- [41] Gaytán, I., M. Á. Mejía, R. Hernández-Gama, L. G. Torres, C. A. Escalante y A. Muñoz-Colunga. 2015. Effects of indigenous microbial consortia for enhanced oil recovery in a fragmented calcite rocks system. *Journal of Petroleum Science and Engineering.* 128:65–72.
- [42] Armstrong, R. T., D. Wildenschild and B. K. Bay. 2015. The effect of pore morphology on microbial enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering.* 130:16–25.
- [43] Gudiña, E. J., A. I. Rodrigues, V. de Freitas, Z. Azevedo, J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues. 2016. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology* 212:144–150
- [44] Fooladi, T., N. Moazami, P. Abdesahian, A. Kadier, H. Ghojavand, W. M. Wan Yusoff and A. A. Hamid. 2016. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 145:510–519.
- [45] Oluwaseun A. C., O. J. Kola, P. Mishra, J. Ravinder Singh, A. K. Singh, S. S. Cameotra and B. Oluwasesan Micheal. Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 6:26–36.



- [46] Ismail, W., I. S. Al-Rowaihi, A. A. Al-Humam, R. Y. Hamza, A. M. El Nayal and M. Bououdina. 2013. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84:168-178.
- [47] Yañez-Ocampo, G. y A. Wong-Villarreal. 2013. Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*. 17(3):12-28.
- [48] Sobrinho, H. B. S., J. M. L., R. D. Rufino, A. L. F. Porto and L. A. Sarubbo. 2013. Biosurfactants: Classification, Properties and Environmental Applications. In: R. D. Rufino and L. Sarubbo (ed). *Biotechnology Vol. 11: Bioremediation*. ResearchGate. Pp. 1-29.
- [49] Tadros, T. F. 2014. *An Introduction to Surfactants*. De Gruyter. Germany.
- [50] Sajna, K. V., R. Höfer, R. K. Sukumaran, L. D. Gottumukkala and A. Pandey. 2015. White Biotechnology in Biosurfactants, chapter 14. In: Pandey, A., R. Höfer, C. Arroche, M. Taherzadeh, and K. M. Nampoothiri (editors). Elsevier-Book Aid International. USA.
- [51] Karlapudi, A. P., T.C. Venkateswarulu, J. Tammineedi, L. Kanumuri, B. K. Ravuru and V. R. Dirisala. 2018. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*. 4:241-249.
- [52] Al-Sulaimani, H., Y. M. Al-Wahaibi, S. Joshi and S. Al-Bahry. 2014. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. Invited Review. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 1(2):147-148.
- [53] McInerney, M. J., D. P. Nagle and R. M. Knap. 2005. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future. In: Ollivier, B. y M. Magot (eds). *Petroleum Microbiology*. ASM PRESS. U.S.A.
- [54] Roldán-Carrillo, T., G. Castorena-Cortés, J. Reyes-Ávila, I. Zapata-Peñasco and Patricia Olguín-Lora. 2012. Effect of porous media types on oil recovery by indigenous microorganisms from a Mexican oil field. *J Chem Technol Biotechnol.* 88:1023–1029.
- [55] Volk, P. H. 2010. 3° Oil recovery: Fundamental approaches and principles of microbially enhanced oil recovery, in: K.N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 2727-2738.