

402794

20



Int. Cl.: C10G, C11D

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

PATENTE DE INTRODUCCIÓN

por 10 años

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA DEGRADACIÓN MICROBIANA DEL PETRÓLEO", a favor de BIOTEKNIKA INTERNATIONAL, INC., de nacionalidad norteamericana, domiciliada en ALEXANDRIA, Virginia 22310 (USA), 5510 Vine Street.

=====

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Introducción se relaciona a un procedimiento para la degradación microbiana del petróleo. Más particularmente, se refiere a un método para degradar sustancias de petróleo, ya sea crudo o refinado, por medio de microorganismos como medio de, por ejemplo, limpiar derrames de aceite como los que pueden ocurrir en mar abierto, en aguas dulces tierra adentro, en playas de arena, en playas de costas rocosas, en líneas de litoral limitadas por rocas, playas sembradas de pedruscos, lagunas afectadas por las mareas y muelles. La invención también es aplicable para limpiar recipientes cerrados tales como, por ejemplo, fondos de buques tanques o tanques de almacenamiento que contienen petróleo crudo, fracciones pesadas de alquitrán, asfaltos y residuos pesados

0777

- 2 - 402794

20



viscosos de petróleo crudo.

- La limpieza del medio ambiente tiene gran importancia en la actualidad tanto para cualquier país en particular como para el mundo. La contaminación en el aire y en el agua son problemas principales en la sociedad tecnológica de la actualidad. Por lo que se refiere a la contaminación en el agua, los derrames de petróleo han llegado a ser un problema cada vez mayor con el advenimiento de la perforación mar adentro y el transporte de petróleo en enormes barcos tanques. Se han hecho muchas proposiciones para la limpieza y/o degradación de tales derrames de aceite, pero ninguno ha tenido un éxito satisfactorio hasta la fecha.

- El resultado final deseado de la degradación de petróleo es restaurar los medios ambientes marinos, la flora y la fauna en el fondo del mar y de los litorales, hasta convertirlos en medios ambientes ecológicamente limpios. El empleo de materiales de origen primordialmente biológico que no sólo sean degradantes para el aceite sino que también sean comestibles, benéficos y por completo no patogénicos a la flora y a la fauna marina, sería especialmente ventajoso. Los detergentes sintéticos, los agentes emulsificadores, los disolventes orgánicos o cualquier otro producto de procesos químicos o de las industrias de la petroquímica, propuestos hasta hoy, no poseen las ventajas inherentes en el empleo de materiales de origen biológico. De hecho, el uso de productos químicos sintéticos a menudo da por resultado una muerte masiva de la fauna y la flora marinas dentro de una amplia área geográfica.



Hasta el presente se han utilizado en esta técnica cuatro métodos principales para limpiar los derrames de petróleo. Son los siguientes:

5. (1) El empleo de barcazas recogedoras de derrames para quitar el petróleo de la superficie del agua. El petróleo que se elimina debe ser eliminado como desecho o debe recuperarse. Sin embargo, las barcazas recogedoras de derrames son solo útiles en aguas calmadas. Este es un método físico.
10. (2) El empleo de barreras o similares para contener la película de petróleo o aceite que va a ser recogida de la superficie de las aguas contaminadas. Este método físico se ha utilizado en aguas calmadas.
15. (3) El empleo de dispersantes químicos, detergentes y solventes, como se explicó brevemente en lo anterior. Puesto que la mayor parte de estos productos químicos son tóxicos a la vida béntica, de litoral y marina, no se espera un empleo muy amplio de los mismos.
20. (4) Se ha tratado de quemar el petróleo crudo, pero el petróleo no sufre una combustión completa, y el negro de humo sin quemar es tóxico. Otro peligro posible reside en el hecho de que las fracciones del petróleo que no se quema por completo y que contienen fenantreno, antracenos y derivados de los mismos, están entre
25. los carcinógenos químicos más potentes conocidos al hombre.
30. Otro de los objetos de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para degradar y limpiar derrames de petróleo en mar abierto, que elimina las desventajas y deficiencias de los métodos ante-



riormente conocidos.

Otro objeto de la presente Patente es proporcionar un proceso para la degradación microbiana del petróleo cuando se desea, por ejemplo, como elemento para la limpieza de derrames de petróleo o para la limpieza de bodegas en los buques tanques o barcos, o tanques de almacenamiento que contienen crudos de petróleo indeseables, fracciones pesadas de alquitrán, asfaltos y residuos pesados, viscosos, de petróleo crudo.

5. Un objeto adicional de la presente Patente es proporcionar un procedimiento para degradar varias sustancias de petróleo de manera fácil, eficiente y en forma relativamente económica.

10. Un objeto aún adicional de la presente Patente es proporcionar microorganismos que son capaces de degradar fracciones de petróleo, dejando una masa de células comestible y benéfica, y que es por completo no patogénica a la fauna y a la flora marina, al hombre y a los animales.

15. Aún otro objeto de la presente Patente es proporcionar un método para la degradación del petróleo, en el que no hay necesidad del manejo, el transporte y el almacenamiento de equipo pesado y voluminoso.

20. Estos y otros objetos y ventajas de la presente Patente serán aparentes para las personas conocedoras de esta técnica, al considerar la siguiente memoria y reivindicaciones.

25. De acuerdo con la presente invención, se logran los objetivos anteriores y se ha descubierto un procedimiento ventajoso para la degradación microbiana de acei-

30.



- te y petróleo que emplea ciertos microorganismos que utilizan los hidrocarburos. La ventaja distintiva y singular de la presente invención es que todos los materiales utilizados se derivan originalmente de sustancias comestibles que no son tóxicas. Es igualmente aplicable a la degradación de petróleo y a la degradación de otros desperdicios industriales en general, tales como sobrantes de fábricas que preparan o enlatan alimentos, fábricas de papel, establos y plantas de productos químicos disolventes, plastificadores, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y otros compuestos cíclicos al medio ambiente. La expresión "petróleo" tal como se utiliza en esta memoria tiene la intención de designar el petróleo crudo así como fracciones de petróleo y productos derivados de petróleo, tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, fenoles, naftalenos, fenantrenos, antracenos, ésteres, etcétera. De esta manera, el término "petróleo" como se utiliza en la presente Patente, se refiere a compuestos orgánicos que contienen carbono, incluyendo alcanos de cadena recta o ramificada (incluyendo parafinas de diferentes pesos moleculares) y otros compuestos alifáticos (incluyendo alicíclicos tales como ciclohexano) así como compuestos heterocíclicos y carboxílicos aromáticos.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.

Se admite que el destino final de los desperdicios de aceite así como de los desperdicios que incluyen aquéllos de origen orgánico, que entran en las aguas naturales, es la degradación (oxidación) por las actividades combinadas de bacterias, actinomicetos, levaduras y

- 30.



hongos imperfectos. Dichos organismos pueden ser de origen marino o terrestre, y pueden ser no patogénicos. En la presente invención se ha aprovechado la elección juiciosa de microorganismos que han sido adaptados para

5. utilizar compuestos altamente seleccionados de carbono como fuente de energía y requerimientos de carbono para su crecimiento.

El proceso de la presente invención para utilizarse por ejemplo en la limpieza de petróleo o aceite de

10. rramado, es un proceso puramente biológico en el que las bacterias seleccionadas, actinomicetos, levaduras y hongos filamentosos que descomponen el petróleo crudo y lo convierten de masas de aceite o petróleo derramado, en masas de células vivientes no tóxicas, comestibles. Es-

15. tas masas de células se canalizan al ciclo de alimentación para alimentar formas superiores de vida marina y, en esta forma, se logra un resultado final muy ventajoso, además de resolver el problema del derramamiento de acei-

20. te o petróleo. No hay necesidad de operaciones de limpieza auxiliares cuando un derrame de aceite se degrada de acuerdo con la invención y, como se indicó anteriormente, tampoco hay necesidad de manejo, transporte y almacenamien-

to de equipo pesado y voluminoso.

Los siguientes microorganismos, todos completa-

25. mente nuevos y no evidentes, se utilizan en la presente invención. Estos microorganismos son especies de carácter especial que han sido mutadas para lograr los objeti-

30. vos de la invención. Han sido depositados con la American Type Culture Collection en Rockville, Maryland, y se les han designado los números de catálogo ATCC:



- Candida parapsilosis, Y15 ATCC 20246
- Candida tropicalis, Y14 ATCC 20247
- Candida utilis, Y13 ATCC 20248
- Aureobasidium pullulans, 1 ATCC 20249
- 5. Myrothecium verrucaria, 1 ATCC 20250
- Cladosporium cladosporioides, 1 ATCC 20251
- Saccharomyces cerevisiae, Y16 ATCC 20252
- Aspergillus sp., K ATCC 20253
- Rhodotorula sp., Y17 ATCC 20254
- 10. Candida lipolytica, Y12 ATCC 20255
- Nocardia corallina, N-301 ATCC 21504
- Nocardia globerula, N-39 ATCC 21505
- Nocardia globerula, N-45 ATCC 21506
- Nocardia opaca, N-300 ATCC 21507
- 15. Nocardia rubra, N-2 ATCC 21508
- Nocardia paraffinae, N-114 ATCC 21509

Estos microorganismos tienen las características que se muestran en las siguientes tablas. Todas las pruebas indicadas son las pruebas standard utilizadas en el campo microbiológico.

T A B L A I A

Bacteria

Características	<u>Nocardia corallina</u> N301 ATCC 21504	<u>Nocardia globerula</u> N39 ATCC 21505	<u>Nocardia globerula</u> N45 ATCC 21506
Cepa Gram	Bacilos Gram positivos poco ramificados	Bastoncillos Gram positivos	Bastoncillos Gram positivos, poco ramificados
Movilidad	Sin movilidad	Sin movilidad	Sin movilidad
Manitol con sales de amoníaco.	-		
Crecimiento en agar de glucosa, pigmentación	Moderado, terso, pigmento color naranja	Grandes, tersas, color marfil	Grandes, tersas, color marfil
Crecimiento a 25° y 37° C		Bueno a 25° C Malo a 37° C	Bueno a 25° C Malo a 37° C
Crecimiento en un caldo de NaCl al 7%			

402794



T A B L A I A (Continuación)

Bacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia corallina</u> N301 ATCC 21504	<u>Nocardia globerula</u> N39 ATCC 21505	<u>Nocardia globerula</u> N45 ATCC 21506
Hidrolizado Almidón			
Nitritos producidos de nitratos.	+	-	-
Crecimiento en caldo de tiosulfato glicolato.	Grande aeróbico, ligero anaeróbico	Ligero aeróbico y anaeróbico	Grande aeróbico, ligero anaeróbico
Producción de indol		-	-
Licuefacción de gelatina	-	-	-
Utilización de citrato	+	+	+
Ureasa	+	+	+
Película en el caldo		Película ligera	Película ligera
Hemólisis o agar sanguíneo con RBC de carnero			20

402794



T A B L A LA (Continuación)

Bacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia corallina</u> N301 ATCC 21504	<u>Nocardia globerula</u> N39 ATCC 21505	<u>Nocardia globerula</u> N45 ATCC 21506
Solubilidad biliar			
Coagulasa en plasma			
H ₂ S en trazas de KI ó TSI			
Utilización de carbohidratos: Lactosa Sacarosa Glucosa Manitol Ramnosa Arabinosa Xilosa Galactosa Maltosa Refinosa Glicerol Quitina	- - - - - -	- + + - + + - + -	+ + + - + - + -

20 APR 1970



* + Indica producción de ácido.

T A B L A LA (Continuación)

Bacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia corallina</u> N301 ATCC 21504	<u>Nocardia globerula</u> N39 ATCC 21505	<u>Nocardia globerula</u> N45 ATCC 21506
N-acetil-D-glucosamina			
Prueba de oxidasa			
Actividad de catalasa			
Combustible JP-4			
Petróleo crudo	utilizado	utilizado	utilizado
Parafinas	utilizado	utilizado	utilizado
Fenol	utilizado	utilizado	utilizado
Naftaleno			

402794

20

- 11 -



T A B L A 1BBacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia opaca</u> N300 ATCC 21507	<u>Nocardia rubra</u> N2 ATCC 21508	<u>Nocardia parafinae</u> N114 ATCC 21509
Cepa gram	Bacilos gram positivos, pocas ramificaciones	Micelio rudimentario gram positivo, que se fragmen- ta hasta formar artrospo- ras cortas	Micelio rudimentario gram positivo, que se fragmenta hasta formar artrosporas cortas
Movilidad	No tiene movilidad	No tiene movilidad	
Manitol con sales de amoníaco			
Crecimiento en agar de gluco- sa, pigmentación	Moderado, terso, color naranja	Moderado, terso, pigmento naranja rojizo	Moderadamente grande, rugoso, color naranja
Crecimiento a 25° y 37°C	Optimo a 30°C	Crece bien a 30°C	
Crecimiento en un caldo de NaCl al 7%			



2

1972

402794

T A B L A 1B (Continuación)

Bacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia opaca</u> N300 ATCC 21507	<u>Nocardia rubra</u> N2 ATCC 21508	<u>Nocardia parafinas</u> N114 ATCC 21509
Hidrolizado Almidón		-	
Nitritos producidos a partir de nitratos	+	-	
Crecimiento en caldo de tior-glicolato	Grande aeróbico, no anaeróbico	Grande aeróbico, ligero anaeróbico	Ligero aeróbico y anaeróbico
Producción de indol			
Licuefacción de gelatina		-	-
Utilización de citrato	+		
Ureasa	+	-	-
Película en el caldo			
Hemólisis o agar sanguíneo con RBC de carnero			



T A B L A 1B (Continuación)

Bacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia opaca</u> N300 ATCC 21507	<u>Nocardia rubra</u> N2 ATCC 21508	<u>Nocardia parafinae</u> N114 ATCC 21509
Solubilidad biliar			
Coagulasa en plasma			
H ₂ S en trazos de KI ó TSI			
Utilización de carbohidratos: * Lactosa Sacarosa Glucosa Manitol Ramosa Arabinosa Xilosa Galactosa Maltosa Refinosa Glicerol Quitina	- - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -

20



* + Indica producción de ácido.

T A B L A 1B (Continuación)

Bacteria

<u>Características</u>	<u>Nocardia opaca</u> N300 ATCC 21507	<u>Nocardia rubra</u> N2 ATCC 21508	<u>Nocardia paraffinae</u> N114 ATCC 21509
N-acetil-D-glucosamina			
Prueba de oxidasa			
Actividad de catalasa			
Combustible JP-4			
Petróleo crudo	utilizado	utilizado	
Parafinas	utilizado	utilizado	
Fenol	utilizado		
Naftaleno	utilizado		

402794

20 AB



T A B L A 2

Levaduras

<u>Características</u>	<u>Candida parapsi-</u> <u>losis.</u> Y15 ATCC 20246	<u>Candida tropi-</u> <u>calis.</u> Y14 ATCC 20247	<u>Candida utilis</u> Y13 ATCC 20248	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u> Y16 ATCC 20254	<u>Rhodotorula sp.</u> Y17 ATCC 20254	<u>Candida lipoly-</u> <u>tica.</u> Y12 ATCC 20255
Crecimiento en agar de glucosa, pigmentación.	Grande, terso, color marfil.	Grande, terso, color marfil.	Grande, terso, color marfil.	Grande, terso, color marfil.	Grande, terso, color naranja.	Ligero, rugoso, marfil opaco.
Crecimiento en caldo de tioglicolato.	Ligero crecimiento.	Crecimiento moderado.	Gran crecimiento anaeróbico.	Ligero aeróbico, grande anaeróbico.	Grande aeróbico, ligero anaeróbico.	
Utilización de citrato.	+	+	+		-	
Ureasa	-	-	-	-	+	-
Utilización de* carbohidratos:						
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Quitina	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Licuefacción de gelatina.						+
Combustible para motores de reacción JP-4						Utilizado

402794



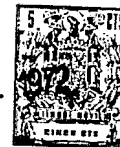
* + Indica producción de ácido.

T A B L A 3

Hongos filamentosos.

<u>Características</u>	<u>Aureobasidium pullo-</u> <u>lans.</u> 1 ATCC 20249 Presentes	<u>Myrothecium verruca-</u> <u>ria.</u> 1 ATCC 20250 Presentes	<u>Cladosporium cladospo-</u> <u>rioides.</u> 1 ATCC 20251 Presentes	<u>Aspergillus sp. K.</u> ATCC 20253 Presentes
Esporas	Blastoesporas lateral- mente en las hifas.	Pequeños conidios	Cadenas ramificadas de blastoesporas.	Conidios en cadena
Tipo de esporas				
Tipo de estructuras fructificantes		Esporodoquio	Conidiforas genicula- das.	Cabezas de conidios que forman un fiáli- do que lleva una ve- sícula. No se encon- tro Cleistothecia.
Decoloración del me- dio	Ligera decoloración en los cultivos vie- jos.	Superficie blanca ma- te en caldo de culti- vo.	Ligera decoloración ma- rrón de cultivos espo- rulados viejos.	Ninguna
Olor	Ninguno definido	Casi sin olor	Muy pequeño olor ran- cio.	Terroso
Factores que afectan la fructificación: Temperatura Luz Medio preferido	25º C. Ninguna Agar de glucosa de sa- bouraud.	25º C. Ninguno Caldo o agar de glu- cosa de Sabouraud.	25º C. Ninguno Agar de glucosa de Sa- bouraud.	25º C. Ninguno Agar de glucosa de Sa- bouraud.
Otros	Crecen pastosos y en forma de levadura; co- lor marfil, se vuelven negros, y con la con- sistencia de cuero en los cultivos viejos.	Superficie gruesa ma- te, color blanco, de- gran crecimiento de- bajo de la superfi- cie.		





Todos los microorganismos anteriores son formas terrestres o de agua dulce. Una de las características singulares y distintivas de todos los microorganismos anteriores es que son del tipo que utilizan hidrocarburos y atacan y degradan al petróleo de acuerdo con los objetivos de la invención.

Se requieren medios variados para las diferentes finalidades del manejo de estos cultivos. Todos los microorganismos empleados en la presente invención crecen en un medio de agua de mar ciento por ciento o con parte de agua de mar y parte de agua destilada. Para el fin de identificación de los cultivos, se observaron todas las reacciones usuales standard bioquímicas mostradas en las tablas anteriores, sobre medios hechos con agua destilada a fin de proporcionar condiciones de crecimiento standard y comparativas.

Se encontró que el siguiente medio es bastante satisfactorio como medio de uso general y para toda finalidad, por ejemplo, para mantener cultivos almacenados:

20. Medio de aplicación general.

Caldo de infusión de corazón (Difco)	23.0 g.
Extracto de levadura	3.0 g.
Glicerol	5.0 ml.
Glucosa	5.0 g.
25. Agar	15.0 g.
H ₂ O (destilada)	1000 ml.

Se utilizó el caldo standard de Bushnell-Haas para el estudio de la utilización de hidrocarburos por los microorganismos. Se encontró que el siguiente medio es bastante apropiado para esta finalidad en relación con

30.



los microorganismos empleados en la presente invención:

	MgSO ₄	0.2 g.
	CaCl ₂	0.02 g.
	KH ₂ PO ₄	1.0 g.
5.	K ₂ HPO ₄	1.0 g.
	NH ₄ NO ₃	1.0 g.
	FeCl ₃	0.05 g.
	Azul de bromotimol	0.008 g.
	H ₂ O (destilada)	1000 ml.

10. Se encontró preferible y ventajoso el siguiente medio, para la producción de células microbianas en gran escala:

	Proteína de semilla de algodón	5.0 g.
	NH ₄ NO ₃	2.5 g.
15.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.5 g.
	MgSO ₄	0.2 g.
	K ₂ HPO ₄	1.0 g.
	Petróleo crudo	5.0 ml.
	Sal marina	35.0 g.
20.	Agua del grifo	1000 ml.

En vez de la sal marina y agua del grifo, puede utilizarse agua de mar natural en el medio anterior. La aireación se proporciona suministrando oxígeno al tanque o recipiente de fermentación. Por lo general, las células bacterianas se recogen después de aproximadamente, dos días, las células de actinomicetos se cosechan después de aproximadamente, cuatro días, los cultivos de levadura se cosechan después de aproximadamente, cinco días, lo que depende de la turbidez, y los cultivos de hongos se cosechan después de aproximadamente cinco días.



El recipiente o fermentador de grandes lotes se siembra con un cultivo joven equivalente comprendido aproximadamente entre cinco y ocho por ciento de la capacidad total del fermentador. Si es necesario, puede emplearse un

5. agente antiespumante, por ejemplo, Dow Antifoam A.

Por lo tanto, ya bien sea un medio de cultivo sintético o un medio nutriente natural, son apropiados para el crecimiento de las cepas de microorganismos empleados en la presente invención, mientras contenga los

10. nutrientes esenciales para el crecimiento de la cepa o las cepas de microorganismos determinados. Dichos nutrientes son bien conocidos e incluyen sustancias tales

como una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, compuestos inorgánicos y similares, que utilizan los microor-

15. ganismos empleados en cantidades apropiadas.

Los microorganismos utilizados en la presente crecen y sobreviven en un medio nutriente acuoso que con- tiene un hidrocarburo o mezcla de hidrocarburos, como fuente principal de carbono. Dichos hidrocarburos inclu-

20. yen parafinas de cadena recta o cadena ramificada (alcanos) que van desde los alcanos gaseosos, tales como metano y propano, alcanos líquidos o semisólidos, tales como

n-pentano, n-octano, n-decano, n-dodecano, n-hexadecano, isopentano, isooctano, incluyendo parafinas sólidas de

25. cadena larga que tienen puntos elevados de fusión, ciclo parafinas tales como ciclohexano y ciclooctano, olefinas de cadena recta o cadena ramificada tales como penteno-2,

hexeno-1, octeno-1, octeno-2, etcétera, cicloolefinas tales como ciclohexeno, hidrocarburos aromáticos tales como

30. benceno, o-xileno, naftaleno, fenantrenos, antracenos,

402794 20



- 21 -

etcétera, y mezclas de los mismos así como hidrocarburos mezclados tales como queroseno, aceites ligeros, aceites pesados, crudos de petróleo, aceites para motores de reacción, gasolina, etcétera. Otras sustancias orgánicas, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y aromáticos heterocíclicos y carbocíclicos, son utilizados por los microorganismos presentes.

10. Junto con los hidrocarburos, pueden utilizarse en el medio de cultivo pequeñas cantidades de otras fuentes de carbono, tales como carbohidratos, por ejemplo, glucosa, fructuosa, maltosa, sacarosa, almidón, hidrolizado de almidón, melasas, etcétera, o cualquier otra fuente apropiada de carbono tal como glicerol, manitol, sorbitol, ácidos orgánicos, etc. Estas sustancias pueden utilizarse ya sea solas o mezclando dos o más de ellas.

15. Como fuente de nitrógeno pueden emplearse varias clases de sales o compuestos inorgánicos u orgánicos, tales como sales de urea o de amoníaco como cloruro amónico, sulfato amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, etcétera, o uno o más de un aminoácido o proteínas crudas mezcladas en combinación, o sustancias naturales conteniendo nitrógeno, tales como licor de infusión de maíz, extracto de levadura, extracto de carne, harina de pescado, peptona, caldo, hidroxilatos de caseína, solubles de pescado, extracto de salvado de arroz, etcétera. Estas sustancias también pueden ser utilizadas ya sea solas o en combinaciones de dos o más de ellas.

20. Los compuestos inorgánicos que pueden añadirse al medio de cultivo incluyen sulfato de magnesio, fosfa-



to sódico, fosfato potásico dihidrogenado, fosfato potásico monohidrogenado, sulfato de hierro u otras sales de hierro tales como cloruro férrico, cloruro de manganeso, cloruro de calcio, cloruro sódico, nitrato amónico, etcétera.

Los microorganismos empleados en la presente invención se cultivan bajo condiciones aeróbicas, tales como agitación aeróbica del cultivo o con agitación y ai reacción del cultivo sumergido, a una temperatura de, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 35°C y a un pH de por ejemplo, aproximadamente de 6 a 8. Los microorganismos son recogidos en un momento apropiado y se utilizan como se explica a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

El procedimiento objeto de la presente invención puede utilizarse para eliminar petróleo y fracciones de petróleo de lugares en los que su presencia constituye una contaminación perjudicial. De esta manera, con este proceso, es posible limpiar derrames de petróleo en mar abierto, en playas arenosas, en playas rocosas, en costas de rocas, en muelles y en aguas de tierra adentro. No hay restricción en cuanto a la fracción de petróleo que puede ser degradable. De acuerdo con ello, el procedimiento puede emplearse para degradar alcanos, alquenos, alquinos, fenoles, naftalenos, fenantrenos, an tracenos, ácidos orgánicos, aldehídos, cetonas, ésteres y similares, es decir, compuestos orgánicos conteniendo carbono, incluyendo compuestos acíclicos, alicíclicos, heterocíclicos y carbocíclicos.

Como ejemplos, se han degradado por completo o

402794

- 23 -

20 AB



básicamente por completo, los siguientes aceites y mezclas de aceites utilizando el procedimiento de la presente invención:

MUESTRA DE ACEITE NO. 1

5. Aceite Quaker State
(SAE 20-20W) 950.0 ml.
Keroseno (Amoco) 200.0 ml.
Gasolina (Esso-"normal") 50.0 ml.
Parafina (Gulf), sólida 50.0 g.
10. * Creolina 1.25 ml.
Azufre, en polvo amarillo 2.5 g.

* Un desinfectante para uso general fabricado por Plough Inc., que consiste en alquitrán de carbón, aceites neutrales, fenoles, jabón e ingredientes inertes (10% en agua).

15.

MUESTRA DE ACEITE NO. 2

Crudo de kirkuk (Irak) que tiene las siguientes características:

- Densidad, API 35.7
20. Temperatura de descongelación -26.11° C
Azufre 1.95 %
Carbono según Conradson WT% 3.26
Viscosidad a 100°F (87.78°C) C.S. 4.78

MUESTRA DE ACEITE NO. 3

25. Combustible para motor de reacción JP-4.

MUESTRA DE ACEITE NO. 4

Combustible Bunker C.

MUESTRA DE ACEITE NO. 5

Aceite crudo de Venezuela.

30. De esta forma, la presente invención también



puede utilizarse para limpiar, por ejemplo, tanques de almacenamiento, compartimientos de bodega de buques tanque en vista de la amplia diversidad de sustancias de petróleo degradables por medio de los microorganismos descritos en la presente.

5. Se describirá ahora un método preferente para combatir los derrames de aceite o de petróleo. Es mejor utilizar una mezcla de la mayor parte o de la totalidad de los microorganismos a fin de obtener una degradación de amplio espectro, aún cuando pueden utilizarse en situaciones especiales, especies sencillas de microorganismos o mezclas seleccionadas de los microorganismos descritos. Los microorganismos se siembran o se dispersan sobre un área de derrame de petróleo por medio de botes, aviones o cualquier otro vehículo apropiado. La mezcla empleada con preferencia incluye un absorbente a base de celulosa para evitar que se extienda el aceite. Son absorbentes a base de celulosa, por ejemplo, la paja, el bagazo, corteza de pino triturada, serrín o cualquier otro producto forestal o agrícola. Con el absorbente también se mezclan nutrientes adicionales para los microorganismos, tales como proteína de semilla de algodón y sales inorgánicas de nitrógeno y fósforo, por ejemplo. Incluidas en la mezcla también hay un número de especies microbianas seleccionadas y elegidas para la operación de limpieza en particular, que depende del tipo de aceite, el lugar geográfico y la estación del año (temperatura). El proceso es aplicable desde una temperatura justamente por encima de la temperatura de congelación (aproximadamente 2°C) hasta aproximadamente 39°C. El tra



bajo de la degradación de aceite comienza enseguida al esparcirse la mezcla sobre la superficie de aceite. La evidencia de la degradación del aceite se aprecia más y más a cada día que pasa. La degradación completa tiene

5. lugar en un período de tiempo tan corto como de una semana, pero puede tardar más, lo que depende de la cantidad de petróleo o aceite derramado y de las condiciones de temperatura.

No es necesario utilizar un absorbente, y los

10. microorganismos pueden utilizarse en forma de pasta acuosa o en forma de gránulos secos con los nutrientes añadidos.

Cuando se desconoce el volumen del derrame de aceite o petróleo, como en los casos de los pozos petrolíferos mar adentro, la concentración de los microorganismos añadidos a la mezcla del absorbente y los suplementos de nutriente debe ser, por lo menos 2.42 kilogramos/hectárea. Cuando se conoce el número de litros de

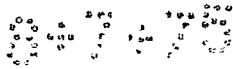
15. aceite en el derrame de aceite, la cantidad de la mezcla de microorganismos, absorbentes y nutrientes aditivos em

20. pleados debe ser cuando menos suficiente para proporcionar una capa de semilla delgada de varias unidades por ciento (P/V). Aproximadamente de 1 a 5% es deseable. Las cantidades substancialmente menores que éstas actúan más

25. lentamente, aún cuando son aún efectivas, mientras que las cantidades substancialmente mayores son innecesarias, excepto en situaciones especiales.

El procedimiento de la presente Patente es un procedimiento puramente biológico en el que las bacterias,

30. los actinomicetes, las levaduras y los hongos filamento-



402794

- 26 -

20 ABR.



5. sos seleccionados descomponen el petróleo crudo o los des perdicios orgánicos y utilizan los hidrocarburos como fuente de carbono para el crecimiento. El procedimiento da por resultado una conversión de muchas toneladas de aceite derramado en muchas toneladas de células microbia nas las que, a su vez, se convierten en alimento para el plancton, moluscos, y otra vida marina. Puesto que la to talidad de los microorganismos, son formas terrestres, morirán cuando se consuma la totalidad del aceite. Por
10. lo tanto, no hay necesidad de limpieza después de que la degradación microbiana ha quedado completa.

15. El proceso de la invención puede aplicarse en aguas abiertas y en playas. Es particularmente útil en costas rocosas en las que no pueden desplazarse vehícu- los de ruedas. El empleo de productos forestales tales como serrín, corteza de pino, harina de madera, borra de algodón, corteza y/o paja de algodón, bagazo, viruta de heno, papel desmenuzado, etc., se utiliza para ayudar a
20. localizar el derrame de aceite y para evitar que se ex tienda adicionalmente. Por ejemplo, la adición de proteí na de semilla de algodón o los subproductos de la molien da de semilla de soja junto con la adición de nutrientes de nitrógeno y fósforo, proporciona un medio nutritivo equilibrado para los microorganismos. Puesto que todos
25. estos aditivos son de procedencia agrícola o forestal, son seguros y no tóxicos. Adicionalmente, estas substan cias proporcionan una matriz sobre la cual la mezcla aña dida de los microorganismos procede para degradar la to talidad del aceite absorbido.

30. El uso de mezclas de microorganismos propor-



ciona una biomasa resultante mayor, que es útil en la ca
dena de alimentos para las formas superiores de vida. La
degradación de petróleo tiene lugar más rápidamente cuan
do el derrame de aceite se trata con 8 hasta 15 cultivos
5. diferentes. Dicha técnica proporciona un mejor medio de
ataque para las diferentes sustancias que pueden estar
presentes en la película de aceite.

El siguiente ejemplo se da simplemente como
ilustrativo de la presente invención y no debe conside-
10. rarse como limitativo. Se han explicado diferentes moda-
lidades preferidas de la invención a través de la solici
tud, y el siguiente sólo es un ejemplo específico de la
misma.

EJEMPLO

15. Se llevó a cabo una prueba de limpieza al aire
libre en un derrame de aceite en la costa Este de Virgi-
nia. Se seleccionaron dos lagunas. La laguna de prueba
era aproximadamente circular y tenía un diámetro de 23
metros, con una garganta de 4 metros. Los diámetros va-
20. riaban un tanto con la marea. El lecho de prueba era un
bastidor cuadrado con tablas de 2.44 x 2.44 metros, las
tablas tenían 2.54 centímetros x 30.48 centímetros con
flotadores a los lados. La laguna de control tenía aproxi
madamente un ancho de 30.48 metros con una garganta con
25. 6 metros de ancho. Ambas lagunas, separadas por una dis-
tancia de tierra aproximada de 107 metros, eran sitios
de prueba ideales. Se derramó petróleo crudo (3.1 litro)
en ambos lechos de prueba.

Se añadió una mezcla de cultivos formada por
30. la totalidad de los diez y seis microorganismos que se



dan en la lista anterior, a 8.17 kilogramos de paja, 1.36 kilogramos de bagazo y 2.50 kilogramos de Proflo (proteína de semilla de algodón). La mezcla resultante se vació en el interior de un barril de plástico de 75.7

5. litros. El calor de la fermentación se hizo cada vez más elevado después de un lapso de entre 3 y 4 horas. La mezcla posteriormente se vació al interior del lecho de prueba. El lecho de control se dejó intacto con el aceite añadido.

10. Los lugares de prueba y de control se verificaron tres días después. El aceite en el lecho de prueba había sido esencialmente degradado en su totalidad. El aceite en el lecho de control estaba esencialmente sin cambios. Cantidades húmedas de pruebas tomadas de los lechos de prueba mostraron la presencia de protozoarios en

15. la muestra del lecho de prueba, pero ninguno en la muestra del lecho de control. También habían algas verdes microscópicas en la muestra de prueba, pero ninguna en la de control.

20. En el sexto día, el aceite en el lecho de prueba había sido degradado hasta más del 95%, mientras que no había substancialmente cambio en el lecho de control. Nuevamente se tomaron muestras de cantidades húmedas de estos lechos de prueba, que mostraron la presencia de

25. algas verdes microscópicas y protozoarios en la muestra del lecho de prueba, pero ninguna en la muestra del lecho de control.

Por lo tanto, el aceite en el lecho de prueba, ha sido substancialmente degradado y la vida marina en

30. el mismo era una vez más, abundante. Sin embargo, en el



lecho de control en donde no se habían puesto microorganismos, permanecía la película de aceite y destruyó substancialmente la totalidad de la vida marina originalmente presente en el mismo.

5. De esta manera puede verse que la presente invención proporciona una manera deseable y ventajosa para degradar y limpiar el petróleo por medio de la degradación microbiana, de manera tal que puede restaurar el área contaminada con aceite hasta hacer un medio ambiente habitable y ecológicamente limpio. Este procedimiento se lleva a cabo de manera segura y en forma relativamente económica, sin ningún riesgo para la vida humana, animal o marina.
- 10.

15. Debe entenderse que la presente invención abarca el empleo no sólo de los microorganismos descritos anteriormente que se dan para fines puramente ilustrativos, sino que también incluye el empleo de los mutantes producidos a partir de los microorganismos enumerados específicamente, siempre y cuando ejecuten la misma función.

20. Además es de entenderse que la invención incluye el empleo de subcultivos obtenidos por diferentes técnicas microbianas standards. Dichos mutantes y/o subcultivos pueden diferir en ciertos aspectos de las nuevas cepas descritas anteriormente, pero trabajarán para degradar el
25. petróleo aproximadamente en la misma forma que se expone anteriormente.

- Habiendo descrito en esta forma la invención, será obvio que la misma puede variarse en distintas formas. Dichas variaciones no deben considerarse como algo
30. aparte del espíritu y el alcance de la invención, y se



tiene la intención de que todas estas modificaciones como son obvias a las personas hábiles en el arte, deben estar incluídas en la presente Patente.

5. Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los efectos de la actual Patente.

N O T A.

Se reivindica como objeto de esta Patente de introducción:

10. 1.- Un procedimiento para la degradación microbiana del petróleo, caracterizado por tratar petróleo, por lo menos con un microorganismo seleccionado del grupo que consiste de cepas no patogénicas, que utilizan hidrocarburos, de Candida parapsilosis, Candida tropicalis,
15. Candida utilis, Aureobasidium pullulans, Myrothecium verrucaria, Cladosporium cladosporioides, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus sp., Rhodotorula sp., Candida lipolytica, Nocardia corallina, Nocardia globerula, Nocardia opaca, Nocardia rubra, y Nocardia paraffinae, durante un
20. tiempo suficiente hasta que el petróleo tratado haya sido substancialmente degradado.
25. 2.- Un procedimiento para la degradación microbiana del petróleo, según la reivindicación 1, caracterizado porque el mencionado microorganismo se mezcla con un material celulósico.
30. 3.- Un procedimiento para la degradación microbiana del petróleo, según la reivindicación 2, caracterizado porque el mencionado microorganismo se mezcla con un material celulósico, una fuente de nitrógeno y una fuente de fósforo.



- 4.- Un procedimiento para la degradación micro
biana del petróleo, según la reivindicación 2, caracteri-
zado porque el mencionado microorganismo se añade al pe-
tróleo en una cantidad de cuando menos 2.42 kilogramos de
5. células en húmedo por cada hectárea de superficie de pe-
tróleo.
- 5.- Un procedimiento para la degradación micro
biana del petróleo, según la reivindicación 1, caracteri-
zado porque el mencionado microorganismo se añade al pe-
10. tróleo en una cantidad comprendida aproximadamente entre
1% y 5% en peso de microorganismo por volumen de petró-
leo.
- 6.- Un procedimiento para la degradación micro
biana del petróleo, según la reivindicación 2, caracteri-
15. zado porque el mencionado material celulósico se selec-
ciona del grupo que consiste de serrín, corteza de pino,
harina de madera, borra de algodón, corteza de semilla
de algodón, paja, bagazo, viruta de eno y papel desmenu-
zado.
20. 7.- Un procedimiento para la degradación micro
biana del petróleo, según la reivindicación 3, caracteri-
zado porque la fuente de nitrógeno mencionada es proteí-
na de semilla de algodón.
- 8.- Un procedimiento para la degradación micro
25. biana del petróleo, según la reivindicación 1, caracteri-
zado porque el mencionado microorganismo se emplea en
forma de una pasta acuosa o en forma de gránulos.
- 9.- Un procedimiento para la degradación micro
biana del petróleo, según las reivindicaciones anterio-
30. res, caracterizado porque el microorganismo es seleccio-

