



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE INGENIERÍA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA EN CIENCIAS DE LA  
TIERRA

PRODUCCIÓN, EVALUACIÓN DE  
BIOPRODUCTOS Y SU EFECTO SOBRE LA  
RECUPERACIÓN DE HIDROCARBUROS

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE INGENIERO PETROLERO

PRESENTA:

ROSA ALVARADO CRUZ

DIRECTOR:

DR. ERICK E. LUNA ROJERO

CODIRETORA:

DRA. PATRICIA OLGUÍN LORA



---

CD.UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F. MARZO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *AGRADECIMIENTOS*

*Siempre me he preguntado si el lugar en el que me encuentro hoy me acerca al que quiero estar mañana, y correspondo infinitamente a todas las personas que me han ayudado a aproximarme*

*Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la **Facultad de Ingeniería**, por permitirme aprender en sus aulas, y al pueblo mexicano que gracias al pago de sus impuestos hace que la educación en la máxima casa de estudios sea prácticamente gratuita.*

*Al **Instituto Mexicano del Petróleo** que me permitió trabajar en sus instalaciones para desarrollar mi tesis, y muy en especial agradezco a la **Dra. Patricia Olguín Lora** por dirigir este trabajo y al **Dr. Erick Luna Rojero** que aceptó ser mi director interno, así como al jurado designado por revisar el documento.*

## *DEDICATORIAS*

*Ofrezco este trabajo a mi familia, a mis padres y hermanos, guerreros y ángeles con los que Dios me permitió compartir mi existencia, los amo.*

*Una etapa muy importante en mi vida universitaria fue el servicio social en la Torre de Pemex, conocí seres humanos muy valiosos: Bretón, Jaime, Caro, Cristi, Mari Lu, Irán, Ale, Edith, al Ing. Gerard y Zertuche, agradezco sus palabras, sus consejos, sus regalos, sus regaños, siempre los recordaré con mucho cariño.*

*También dedico mi tesis al Ingeniero Gerardo Rodríguez Gómez, gracias por su apoyo profesional y personal, por sus enseñanzas y su preocupación para que yo sea mejor en todos los aspectos de mi vida.*

*A mis compañeros, amigas y amigos de la universidad, los recordaré siempre, Dios nos bendiga en nuestra vida profesional, espero nos encontremos en algún momento.*

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1 ORIGEN DEL PETRÓLEO .....	8
1.2 PRODUCCIÓN DEL PETRÓLEO .....	9
1.3 CLASIFICACIÓN DEL ACEITE .....	13
1.4 ETAPAS DE RECUPERACIÓN DE ACEITE .....	15
1.4.1 <i>Recuperación Primaria</i> .....	15
1.4.2 <i>Recuperación Secundaria</i> .....	16
1.4.3 <i>Recuperación Mejorada</i> .....	16
1.4.3.1 <i>Parámetros importantes en la recuperación mejorada</i> .....	17
1.4.3.2 <i>Métodos de recuperación mejorada de hidrocarburos (EOR)</i> .....	22
<b>CAPITULO 2: ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
2.1 RECUPERACIÓN DE HIDROCARBUROS MEDIANTE BIOPRODUCTOS .....	24
2.1.1 <i>Mecanismos de MEOR</i> .....	25
2.1.2 <i>Bioproductos</i> .....	27
2.1.3 <i>Trabajos realizados con Bioproductos</i> .....	30
2.2 JUSTIFICACIÓN .....	33
2.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	33
2.3.1 <i>Hipótesis</i> .....	33
2.3.2 <i>Objetivo General</i> .....	33
2.3.3 <i>Objetivos particulares</i> .....	33
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	34
3.2 MICROORGANISMOS .....	35
3.2.1 <i>Cultivo mixto anaerobio termófilo</i> .....	35
3.2.2 <i>Cepas aerobias IMP-X y 1486</i> .....	35
3.3 MEDIOS DE CULTIVO .....	36
3.3.1 <i>Composición del medio para la reactivación del cultivo mixto anaerobio termófilo</i> .....	36
3.3.2 <i>Composición del medio de para la reactivación de las cepas aerobias</i> .....	37
3.4 REACTIVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS .....	37
3.4.1 <i>Reactivación del cultivo mixto anaerobio termófilo</i> .....	38
3.4.2 <i>Reactivación de las cepas puras IMP-X y 1486</i> .....	38
3.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE .....	39
3.5.1 <i>Cinética con el cultivo mixto anaerobio termófilo</i> .....	39
3.5.1 <i>Cinética con las cepas puras IMP-X y 1486</i> .....	39
3.6 RECUPERACIÓN DE HIDROCARBUROS EN COLUMNAS EMPACADAS Y NÚCLEO .....	40
3.6.1 <i>Columnas empacadas</i> .....	40
3.6.1.1 <i>Material poroso y acondicionamiento</i> .....	40
3.6.1.2 <i>Columnas</i> .....	40
3.6.2 <i>Núcleo de caliza</i> .....	42
3.6.2.1 <i>Material poroso y acondicionamiento</i> .....	42
3.6.2.2 <i>Condiciones del experimento</i> .....	42
3.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	43
3.7.1 <i>Tinción de Gram</i> .....	43

3.7.2 Determinación de biomasa .....	43
3.7.3 Determinación de Dióxido de Carbono por cromatografía de gases.....	44
3.7.4 Determinación de azúcares totales.....	45
3.7.5 Determinación de solventes y ácidos.....	46
3.7.6 Dispersión de la gota.....	47
3.7.7 Tensión superficial.....	47
3.7.8 Tensión interfacial.....	49
3.7.9 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).....	49
3.7.10 Determinación del ángulo de contacto y tensión interfacial .....	50
3.7.11 Determinación de viscosidad.....	51
<b>CAPÍTULO4: RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS .....	52
4.1.1 Cultivo mixto anaerobio termófilo .....	52
4.1.2 Cepas aerobias IMP-X y 1486.....	53
4.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE .....	55
4.2.1 Crecimiento y producción de biosurfactante con el cultivo mixto anaerobio termófilo.....	55
4.2.2 Consumo de sustrato y producción de CO <sub>2</sub> .....	57
4.2.3 Tensión superficial y Dispersión de la gota .....	58
4.2.4 Crecimiento y producción de biosurfactante con las cepas aerobias IMP-X y 1486.....	59
4.2.5 Evaluación de la producción de biosurfactante por medio de la tensión y el halo de dispersión de aceite con las cepas aerobias IMP-X y 1486. ....	61
4.2.6 Consumo de sustrato y crecimiento microbiano.....	62
4.2.7 Concentración micelar crítica (CMC).....	63
4.3 VISCOSIDAD DEL ACEITE A RECUPERAR Y DEL BIOPRODUCTO.....	64
4.4 DETERMINACIÓN DE TENSIÓN INTERFACIAL Y ÁNGULO DE CONTACTO CON EL BIOPRODUCTO DE LA CEPA IMP-X.....	66
4.5 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CAPILAR Y FACTOR DE RECUPERACIÓN CON EL BIOPRODUCTO DE LA CEPA IMP-X.....	67
4.6 RECUPERACIÓN DE ACEITE CON EL BIOPRODUCTO DE LA CEPA IMP-X EN UN NÚCLEO DE CALIZA ....	69
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
5.1 CONCLUSIONES.....	72
5.2 RECOMENDACIONES.....	74
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
FIGURA 1. DEMANDA DE ENERGÉTICOS A NIVEL MUNDIAL .....	9
FIGURA 2. PRODUCCIÓN DE PETRÓLEO CRUDO A NIVEL GLOBAL EN MILES DE MILLONES DE BARRILES POR DÍA. BP, 2012.....	10
FIGURA 3. PRODUCCIÓN DE CRUDO EN MÉXICO POR REGIÓN PETROLERA.....	11
FIGURA 4. PRODUCCIÓN DE CRUDOS MEXICANOS AL AÑO 2011 .....	11
FIGURA 5. COMPORTAMIENTO DE LA SATURACIÓN RESIDUAL CONFORME AL CAMBIO DEL NÚMERO CAPILAR. ....	19
FIGURA 6. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA CUMPLIR LOS OBJETIVOS PROPUESTOS .....	34

FIGURA 7. COLUMNAS EMPACADAS E IMPREGNADAS CON ACEITE ANTES DE LA INYECCIÓN DEL BIOPRODUCTO .....	41
FIGURA 8. TENSÍOMETRO DU NOUY.....	48
FIGURA 9. OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO DEL CULTIVO MIXTO ANAEROBIO, SE OBSERVA UNA TINCIÓN GRAM NEGATIVA .....	52
FIGURA 10. GRAM DE LA CEPA IMP-X, LOS MICROORGANISMOS PRESENTARON UNA TINCIÓN GRAM NEGATIVA.....	53
FIGURA 11. LA CEPA 1486 OBTUVO UNA TINCIÓN DE GRAM NEGATIVA. ....	54
FIGURA 12. CRECIMIENTO MICROBIANO (PROTEÍNA) Y DISMINUCIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DEL CULTIVO MIXTO ANAEROBIO.....	56
FIGURA 13. CONSUMO DE SUSTRATO Y PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> DEL CULTIVO MIXTO ANAEROBIO.....	57
FIGURA 14. TENSIÓN SUPERFICIAL Y DISPERSIÓN DE LA GOTA DEL CULTIVO MIXTO ANAEROBIO .....	58
FIGURA 15. CRECIMIENTO MICROBIANO (PROTEÍNA) Y PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTE, A) CEPA IMP-X Y B) CEPA 1486.....	60
FIGURA 16. DISPERSIÓN DE LA GOTA DEL BIOPRODUCTO DE LA CEPA IMP-X FIGURA A), CEPA 1486 FIGURA B).....	61
FIGURA 17. CONSUMO DE SUSTRATO DEL MICROORGANISMO AEROBIO 1486. ....	62
FIGURA 18. CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA CON EL BIOPRODUCTO, A) DE LA CEPA IMP-X Y B) CON EL DE LA CEPA 1486 .....	63
FIGURA 19. VISCOSIDAD Y DENSIDAD DEL BIOPRODUCTO DE LA CEPA IMP-X.....	64
FIGURA 20. VISCOSIDAD Y DENSIDAD RELATIVA DE LOS CRUDO A RECUPERAR EN A) COLUMNAS EMPACADAS Y B) NÚCLEO .....	65
FIGURA 21. ÁNGULO DE CONTACTO PARA UN SISTEMA ROCA-ACEITE MEDIANO-BIOPRODUCTO A 70 °C .....	66
FIGURA 22. COMPORTAMIENTO DEL NÚMERO CAPILAR PARA UNA SOLUCIÓN SALINA Y EL BIOPRODUCTO ...	68
FIGURA 23. RECUPERACIÓN SECUNDARIA Y MEJORADA DE ACEITE PESADO EN NÚCLEO DE CALIZA .....	69
FIGURA 24. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE ACEITE EN EL NÚCLEO DE CALIZA POR RECUPERACIÓN SECUNDARIA Y EFECTO MICROBIANO.....	70
FIGURA 25. PRODUCCIÓN DE ACEITE EN EL NÚCLEO DE CALIZA POR INYECCIÓN DE AGUA BIDEFILADA Y BIOPRODUCTO, COMPORTAMIENTO DE LA PRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE EL PROCESO. ....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRODUCCIÓN DE ACEITE POR TIPO Y REGIÓN PRODUCTORA (PEMEX, 2012) .....	12
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DEL ACEITE DE ACUERDO A SUS GRADOS API (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2005) ...	13
TABLA 3. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CRUDOS MEXICANOS.....	14
TABLA 4. EFECTO DE LOS BIOPRODUCTOS SOBRE EL ACEITE .....	26
TABLA 5. MICROORGANISMOS Y EFECTO DE LOS BIOPRODUCTOS EN YACIMIENTOS PETROLEROS .....	29
TABLA 6. APLICACIONES RECIENTES DE MEOR A DIFERENTES ESCALAS .....	31
TABLA 7. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO TERMÓFILO. ...	36
TABLA 8. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE LAS CEPAS AEROBIAS .....	37
<b>TABLA 9.</b> TENSIÓN INTERFACIAL DEL BIOPRODUCTO A UNA CONCENTRACIÓN DE 2,000 PPM.....	66

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

El petróleo es la principal fuente de energía para las actividades del hombre, además del beneficio de los diversos materiales que se obtienen a partir de este hidrocarburo. Proviene de la materia orgánica depositada y acumulada durante el proceso de sedimentación a través de una serie de transformaciones que se produjeron en el subsuelo. Sin embargo, esta fuente de energía no es renovable, por lo que existe el interés en el uso de nuevas tecnologías que permitan su máxima obtención con mínimo impacto al ambiente (Newberry y Thierry, 2007).

Los métodos convencionales de extracción no liberan todo el aceite existente en el yacimiento, dejando en él más del 50% del aceite original principalmente pesado y extrapesado. Uno de los métodos prometedores para su recuperación son los métodos biológicos que utilizan microorganismos y sus bioproductos o solamente los bioproductos.

Existen principalmente dos formas de incrementar la recuperación de aceite remanente en el yacimiento en su etapa terciaria, las cuales pueden ser inducir la porosidad y permeabilidad del yacimiento y reducir al mínimo la tensión interfacial. Los bioproductos tienen propiedades de reducir la tensión interfacial, cambiar la mojabilidad y cuando los bioproductos son ácidos, éstos ayudan a incrementar la porosidad y permeabilidad de la roca (Marshall, 2008).

Por lo que en el presente trabajo se producirán bioproductos y se determinará su efecto sobre la recuperación de hidrocarburos.



## 1.1 Origen del Petróleo

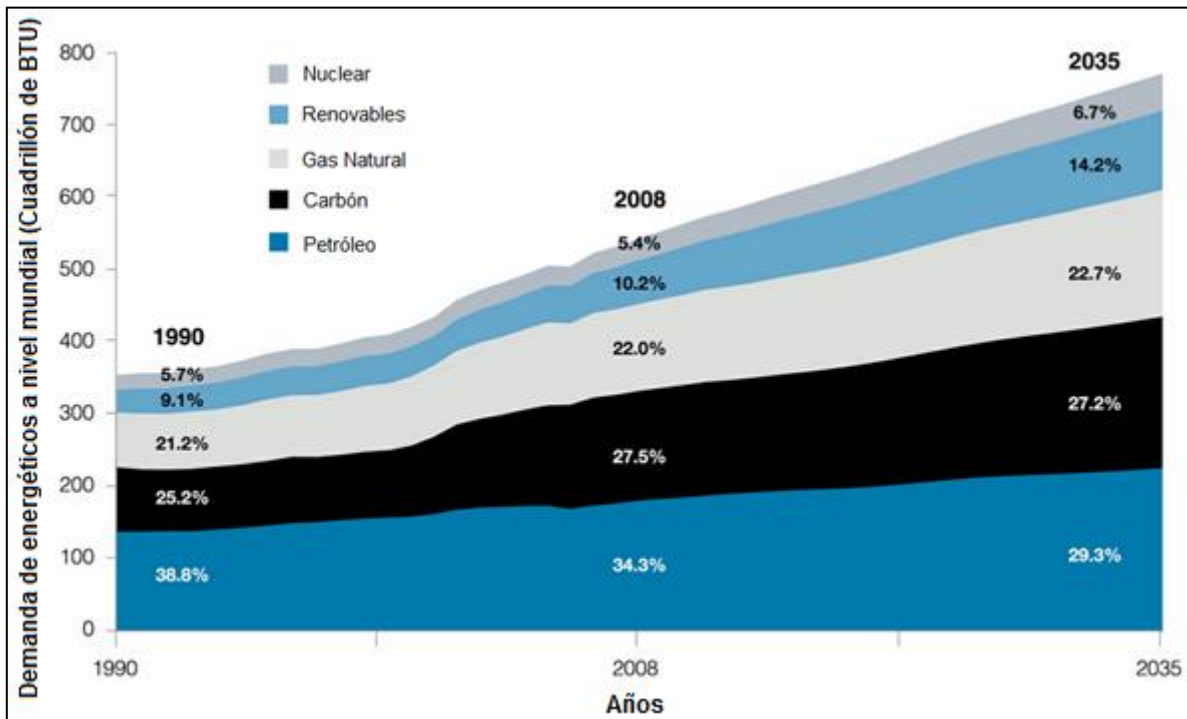
El petróleo es una mezcla de hidrocarburos (compuesto de hidrógeno y carbono) que se encuentra en las cuencas sedimentarias, es la principal fuente de energía utilizada en las industrias y dos teorías: orgánica e inorgánica explican su origen.

La teoría orgánica sostiene que mares y océanos fueron habitados hace millones de años por crustáceos, moluscos, plancton y peces que al morir se depositaron en el fondo del océano y fueron cubiertos por finos sedimentos con restos vegetales que llegaron de continentes a través de ríos. Después de mucho tiempo la materia orgánica y los sedimentos gracias a la acción de microorganismos, altas temperaturas y presiones generaron kerógeno que es parte de la roca madre o sedimentarias y al pasar el tiempo se convirtió en petróleo y formaron las cuencas sedimentarias que son formadas por estratos siendo el más antiguo el que se encuentra en el fondo si es que no ocurre algún evento geológico.

La teoría inorgánica explica el origen del petróleo como una serie de reacciones químicas entre el azufre, calcio y agua caliente; sin embargo, ésta teoría es menos aceptada ya que las cantidades de estos elementos y compuestos son insuficientes para justificar las reservas de aceite que se tienen (Donaldson et al., 1985).

## 1.2 Producción del petróleo

La figura 1 muestra la demanda de energéticos a nivel mundial, se observa que el petróleo es el energético con mayor demanda a partir de 1990 y a lo largo del tiempo según la proyección de la figura 1. Se observa que las fuentes de energía no renovables que incluyen el petróleo, carbón y gas natural han sido las más utilizadas (EIA, Annual Energy Outlook 2011).

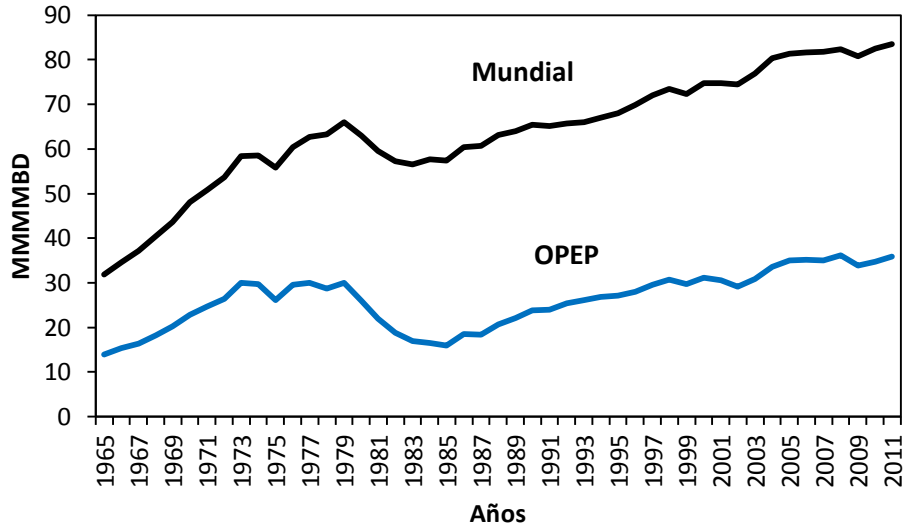


**Figura 1.** Demanda de energéticos a nivel mundial

Hay otras fuentes de energía como el carbón, la energía hidráulica y la nuclear que contribuyen a satisfacer las necesidades de la humanidad, sin embargo el mundo sigue utilizando mayormente combustibles fósiles, para satisfacer sus necesidades de energía.

La figura 2 describe el comportamiento de la producción de crudo del año 1960 a 2011. Se observa que del año 1960 a 1975 la producción se triplicó, debido al desarrollo de registros geofísicos, lo que permitió evaluar de manera más precisa

las formaciones o intervalos productores a disparar en los pozos (British Petroleum Statistical Review, 2012).



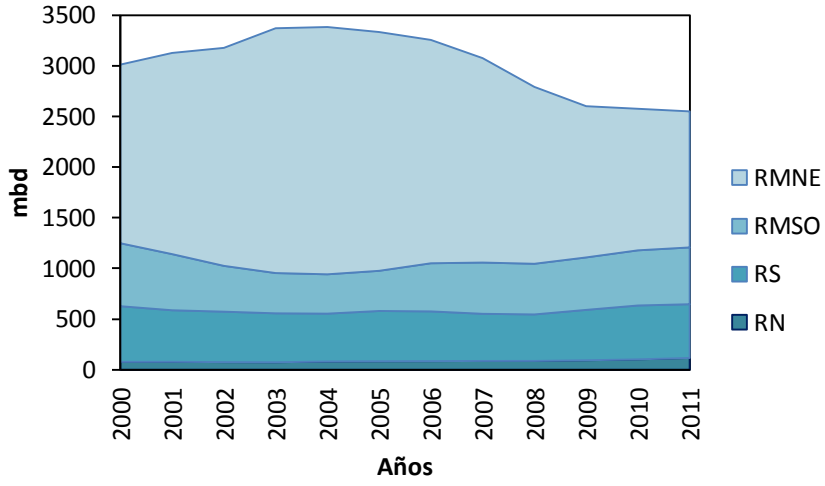
**Figura 2.** Producción de petróleo crudo a nivel global en miles de millones de barriles por día. BP, 2012

La curva azul representa la producción de los países productores de petróleo de todo el mundo, mientras que la negra sólo incluye a las naciones que conforman la Organización de Países Exportadores de Petróleo a la cual México no pertenece.

México obtiene el 90 % de su energía de los hidrocarburos. Ocupa el séptimo lugar a nivel mundial en producción de aceite y el treceavo en producción de gas. (Oil and Gas Journal, 2012).

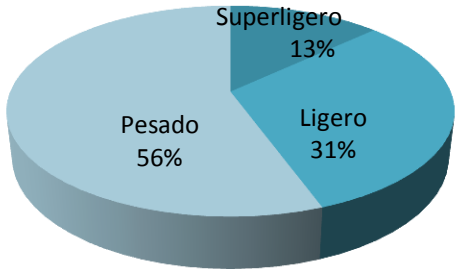
La producción de crudo en México se obtiene principalmente de la Región Marina Noreste (RMNE) seguida de la Región Marina Suroeste (RMSO), después de la Región Sur (RS) y por último la Región Norte (RN).

La figura 3 muestra el comportamiento de la producción de petróleo en México del año 2000 al 2011 en miles de barriles diarios (mbd).



**Figura 3.** Producción de crudo en México por región petrolera

En México el mayor porcentaje de las reservas de aceite son de crudo pesado, seguido del ligero y superligero (figura 4). Por lo que es difícil su recuperación y movilización para su transformación (Anuario Estadístico Pemex, 2012).



**Figura 4.** Producción de crudos mexicanos al año 2011

La tabla 1 muestra la producción de aceites en las cuatro regiones petroleras y el tipo de aceite que producen. Se observa que la región que más aporta crudo es la Marina Noreste, la cual produce mayormente crudo pesado y muy poco ligero, las únicas regiones que producen aceite superligero son la región Sur y la Región Marina Suroeste siendo más alta la producción de éste tipo de crudo en la Región Sur. Se observa que hay un una diferencia de 25.8 mmb del año 2010 al año 2011, lo que significa que la producción va disminuyendo.

**Tabla 1.** Producción de aceite por tipo y región productora (PEMEX, 2012)

<b>Producción</b>		<b>Tipo de aceite (mmb)</b>		
		<b>Pesado</b>	<b>Ligero</b>	<b>Superligero</b>
<b>total de crudo</b>	<b>Región</b>			
<b>(mmb)</b>				
<b>Año 2010</b>	<b>Región</b>	1464	792.3	319.6
	Marina Noreste	1380.3	16.9	
	Marina Suroeste	0.2	445.8	98.4
	Norte	66.7	35.7	
	Sur	16.8	293.9	221.1
	2575.9			
<b>Año 2011</b>	<b>Región</b>	1417.1	798.3	334.7
	Marina Noreste	1322.7	20.1	
	Marina Suroeste	0.1	467.4	93
	Norte	77.6	38.7	
	Sur	16.7	272.2	241.7
	2550.1			

### 1.3 Clasificación del aceite

Debido a la complejidad que representa la gama de hidrocarburos presentes en el petróleo, se decidió emplear la clasificación de éstos de acuerdo a su química, por lo que se identifican las familias como: Parafinas, Isoparafinas, Aromáticos, Naftenos y Olefinas (PIANO) (Rodríguez-Martínez, 2005).

La industria mundial de hidrocarburos líquidos, clasifica al aceite según su densidad con el parámetro internacional del American Petroleum Institute (API). La tabla 2 muestra la clasificación del aceite crudo.

**Tabla 2.** Clasificación del aceite de acuerdo a sus grados API (Rodríguez-Martínez, 2005)

<b>Aceite Crudo</b>	<b>Densidad (gr/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>°API</b>
Extrapesado	1-	Menor a 10
Pesado	0.93 - 1	10.1 - 22.3
Mediano	0.88 - 0.92	22.4 - 31.1
Ligero	0.84-0.87	31.2 - 39
Superligero	0.83	Mayor a 39

En México se producen alrededor de 17 tipos de crudo y se comercializan sólo 3: Maya, Istmo y Olmeca, los cuales se describen en la tabla 3.

El aceite maya es un aceite pesado con una calidad de 22 °API y 3.3% de azufre en peso, el crudo Istmo es ligero con 33.6 °API y 1.3% de azufre en peso, el aceite Olmeca es un aceite superligero con una gravedad API de 39.3 y .8% de azufre en peso.

**Tabla 3.** Clasificación y características de los crudos mexicanos

<b>Características</b>	<b>Maya</b>	<b>Istmo</b>	<b>Olmeca</b>
<b>Gravedad API</b>	21.3	33.1	38.7
<b>Análisis Elemental %</b>			
Carbón	83.96	85.4	85.91
Hidrogeno	1.8	12.68	12.8
Oxígeno	0.35	0.33	0.23
Nitrógeno	0.32	0.14	0.07
Azufre	3.57		0.99
		1.45	
Relación de H/C	1.687		1.788
		1.782	
<b>Metales (ppm)</b>			
Níquel	53.4	10.2	1.6
Vanadio	298.1	52.7	8
<b>Asfáltenos %</b>			
nC <sub>5</sub>	14.1	3.63	1.05
nC <sub>7</sub>	11.32	3.34	0.75
	<b>K<sub>UOP</sub></b>		
	12.00	11.89	11.70

## 1.4 Etapas de recuperación de aceite

Un yacimiento petrolero puede ser explotado bajo tres etapas primaria, secundaria y terciaria las cuales siempre tienen el objetivo de maximizar el valor de los hidrocarburos utilizando herramientas que lo permitan técnica y económicamente.

### 1.4.1 Recuperación Primaria

La recuperación primaria es la etapa cuando el yacimiento produce el aceite con su propia energía, dependiendo de las características de los yacimientos los mecanismos de empuje que se presentan son:

- **Expansión de roca y los fluidos:** Ocurre en los yacimientos bajosaturados, hasta que se alcanza la presión de saturación. La expulsión del aceite se debe a la expansión del sistema (agua congénica, roca y fluidos).
- **Gas disuelto liberado:** Una vez alcanzada la presión de saturación el gas liberado en el yacimiento no fluye a los pozos, sino que se acumula hasta alcanzar la saturación de gas crítica que es cuando el gas llega a una fase continua, y debido a que su compresibilidad es mayor que la del agua y la roca, el efecto de éstos es despreciable. La recuperación por este empuje es de 5 al 35 %.
- **Casquete de Gas:** este empuje consiste en una invasión progresiva de la zona de aceite por gas, acompañada por un desplazamiento direccional del aceite fuera de la zona de gas libre y hacia los pozos productores. Se alcanza una recuperación de aceite del 20 al 40%, sin embargo si las condiciones de segregación son favorables se tiene una recuperación del 60% o más.
- **Empuje Hidráulico:** el agua invade y desplaza al aceite, progresivamente, desde las fronteras exteriores del yacimiento hacia los pozos productores. La recuperación va del 35 al 75%.
- **Segregación gravitacional:** Es la tendencia del agua, aceite y gas a distribuirse en el yacimiento de acuerdo a sus densidades. Los yacimientos



con condiciones propicias a este desplazamiento son de gran espesor, alto relieve estructural, alta permeabilidad, así los fluidos pesados van al fondo y el gas en la cima. Es el mecanismo de producción con mayor eficiencia, sin embargo no es común que se presente en los yacimientos, se logran factores de recuperación alrededor de 60%.

- Combinación de empujes: La mayoría de los yacimientos quedan sometidos durante su explotación a más de uno de los mecanismos de desplazamiento.
- Dentro de la recuperación primaria encontramos también la aplicación de Sistemas Artificiales y se tiene de un 10% a un 25% de recuperación del aceite original en el yacimiento. (Garaicochea, 1991).

#### **1.4.2 Recuperación Secundaria**

La Recuperación Secundaria tiene por objetivo mantener la presión mediante el bombeo de agua través de los pozos de inyección y así producir aceite remanente. Otra modalidad es la inyección de gas hidrocarburo en una capa de gas o directamente en el aceite, el gas puede ser inyectado por un tiempo considerable hasta un año, mientras los pozos productores se cierran hasta que la presión se restablece y se reanuda la producción. En esta etapa se considera que los cambios fisicoquímicos del sistema roca-fluidos del yacimiento son despreciables y no contribuyen a incrementar el factor de recuperación.

En conjunto la etapa Primaria y Secundaria contempla una recuperación de aceite del 8 al 30% (Khire y Khan, 1994).

#### **1.4.3 Recuperación Mejorada**

La recuperación terciaria, también llamada recuperación mejorada o EOR por sus siglas en inglés (Enhanced Oil Recovery) describe la etapa de recuperación mejorada en la producción de hidrocarburos. Comprende la inyección de fluidos ajenos al yacimiento y que generan un desplazamiento de aceite más efectivo que

los que se obtienen por los mecanismos de empuje asociado al mismo. Excluye el mantenimiento de presión, así como la inyección de agua. Los métodos EOR pueden ser empleados en cualquier etapa de producción del yacimiento.

EOR se define como los procesos que involucran la inyección de algún tipo de fluido al yacimiento. Los fluidos inyectados y procesos de inyección suplen la energía natural presente en los yacimientos para desplazar aceite hacia los pozos productores. Los fluidos inyectados interactúan con el sistema roca-fluido del yacimiento para crear condiciones favorables para la recuperación del aceite, modificando propiedades de la roca y los fluidos, como por ejemplo, la disminución de la tensión interfacial, hinchamiento del aceite, reducción de la viscosidad del aceite, modificación de la mojabilidad o favorecer el comportamiento de la fase aceite. En la etapa terciaria aún se puede recuperar de un 5 a un 15% del aceite remanente (Green and Willhite, 1998).

Aunque en un principio se consideraban la última etapa de producción, los procesos EOR no se restringen a una etapa de recuperación en particular, se pueden aplicar desde el inicio de la producción del yacimiento.

El objetivo de los métodos de EOR es disminuir la saturación residual de aceite que tiene todavía el yacimiento, y que se encuentra en los poros de la formación retenida por las fuerzas capilares y viscosas, que impiden que fluya hacia los pozos (Saidi, 1987).

#### **1.4.3.1 Parámetros importantes en la recuperación mejorada**

En los procesos de EOR el aceite residual se mueve en el yacimiento de acuerdo a las fuerzas capilares y superficiales.

El efecto de las fuerzas capilares en el atrapamiento del aceite en los poros de la roca son cuantificadas por el Número Capilar también llamado Número de Weber que es la relación entre las fuerzas viscosas y capilares (Ec. 1).

$$N_c = \frac{v\mu}{\sigma \cos\theta} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

$v$ : Velocidad del fluido desplazante (Longitud/tiempo)

$\mu$ : Viscosidad del fluido desplazante (Fuerza\*Longitud<sup>-2</sup>\* tiempo<sup>-1</sup>)

$\sigma$ : Tensión interfacial entre el aceite y el agua (Fuerza/Longitud)

$\theta$ : Ángulo de contacto (grados)

La tensión interfacial es la fuerza contráctil por unidad de longitud que existe en la interface de dos fluidos inmiscibles como el aceite y el agua, cuanto menor es la tensión interfacial los fluidos tienden a ser miscibles. Existen agentes de superficie activa o surfactantes que interactúan en la interface y logran reducir la tensión interfacial (Dake, 2001).

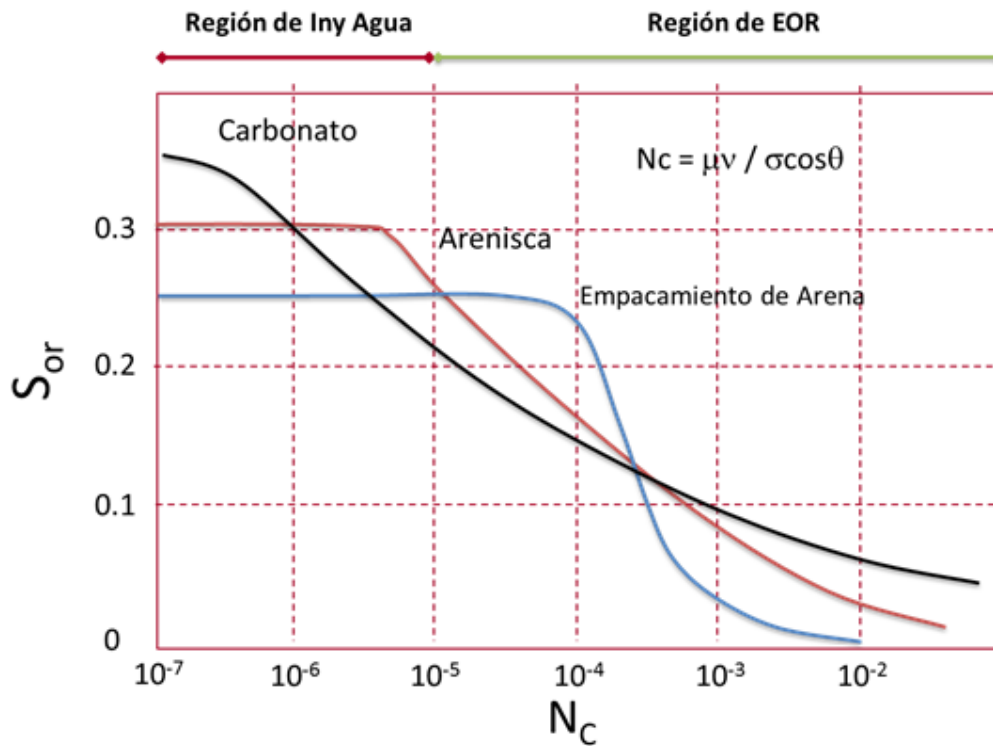
La tensión interfacial del petróleo y el agua se encuentra en un rango de 15 a 35 dinas/cm a 70°F, 8- 25 dinas/cm a 100°F, 8-19 dinas/cm a 130°F (Ekwere, 2007).

Si el Número Capilar es mayor, la saturación de aceite residual ( $S_{or}$ ) es menor, por lo tanto la recuperación de crudo aumenta, como se muestra en la figura 5. Así que para lograr que el NC aumente se pretende reducir la tensión interfacial que existe entre el petróleo y el agua. Además se observa que la saturación residual del aceite por un desplazamiento inmiscible en un medio poroso es función de la tensión interfacial entre los fluidos, la mojabilidad, y viscosidad.

Si la tensión interfacial disminuye, más miscibles son los fluidos y entonces se tendrá un único fluido saturando el medio poroso, dando lugar a un incremento de movilidad, si la interface de los dos fluidos inmiscibles desaparece el número capilar tiende a infinito y la eficiencia de desplazamiento será del 100% en los poros con aceite contactados por el fluido desplazante. (Amyx et al., 1986)

La saturación de aceite residual puede estar por debajo o encima del 30% dependiendo de factores como movilidad, propiedades del medio poroso, tamaño y distribución de poro, permeabilidad y mojabilidad, en general es más difícil para un fluido no mojante desplazar a un mojante, que un mojante a uno no mojante (Anderson, 1986).

La figura 5 considera la recuperación secundaria por inyección de agua y recuperación terciaria en una columna empacada de arena, en un carbonato y en una arenisca. Se observa que se tiene mayor NC en los procesos EOR utilizando el carbonato. La  $S_{or}$  decrece y NC incrementa, éste puede aumentar por el incremento de la viscosidad del fluido desplazante o la velocidad de éste, sin embargo el método más efectivo para aumentar el NC es disminuyendo la tensión interfacial.



**Figura 5.** Comportamiento de la Saturación residual conforme al cambio del número capilar.

La eficiencia de desplazamiento (FR) es el producto de la eficiencia microscópica ( $E_D$ ) y la eficiencia macroscópica, también llamada eficiencia de barrido volumétrico ( $E_V$ ) (Ec. 2).

$$FR = E_D E_V \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

$E_D$ : es una medida de la efectividad del fluido desplazante para mover el aceite, está relacionado con la movilidad a escala de los poros y refleja la de la saturación de aceite residual ( $S_{or}$ ) en las regiones contactadas por el fluido desplazante.

$E_V$ : es la medida en porcentaje de la efectividad del fluido desplazante para barrer areal y verticalmente el volumen de un yacimiento y así mover el petróleo desplazado hacia los pozos productores.

La movilidad ( $\lambda$ ) de un fluido es la relación que existe entre la permeabilidad efectiva ( $k_f$ ) de un fluido y su viscosidad ( $\mu_f$ ):  $\lambda = \frac{k_f}{\mu_f}$ .

En un flujo multifásico se tiene una relación de movilidad (M) generalmente se expresa como la relación entre el fluido desplazante sobre el desplazado  $M = \frac{\lambda_w}{\lambda_o}$ .

Si M es mayor que uno, entonces el agua es más móvil respecto al crudo, si M es menor que uno el crudo se mueve más fácilmente que el agua y se tiene una relación de movilidad favorable (Anderson, 1986).

Este factor afecta a la eficiencia de desplazamiento, es decir, en la eficiencia microscópica de desplazamiento dentro de los poros. Si M es mayor a uno se tiene un desplazamiento ineficiente ya que el fluido desplazante fluye sobrepasando al fluido desplazado produciendo una canalización viscosa así que se debería inyectar más fluido para alcanzar una saturación de aceite residual en los poros.

La permeabilidad es la capacidad de la roca de permitir el flujo a través de ella. La permeabilidad relativa es la relación entre la permeabilidad efectiva y la

permeabilidad absoluta, da una medida de la forma como un fluido se desplaza en el medio poroso. La suma de las permeabilidades relativas es menor de 1.

La permeabilidad absoluta se tiene cuando un fluido satura 100% el medio poroso. Normalmente, el fluido de prueba es aire o agua. La permeabilidad efectiva es la medida de la permeabilidad a un fluido que se encuentra en presencia de otro u otros fluidos que saturan el medio poroso. La permeabilidad efectiva es función de la saturación de fluidos (Ekwere, 2007).

El ángulo de contacto se forma cuando dos fluidos no miscibles están en contacto con la roca, es una medida de la mojabilidad que es una propiedad que tiene el fluido de esparcirse o no sobre una superficie sólida, el fluido mojante puede ser agua o aceite, el gas siempre es no mojante. La mojabilidad controla la localización, flujo y distribución de los fluidos en el yacimiento.

Si el ángulo de contacto es menor a  $90^\circ$  el agua es el fluido que moja al sólido se le nombra “mojante”, si es mayor a  $90^\circ$  el fluido mojante es el aceite. La mojabilidad depende de la heterogeneidad de la roca, rugosidad, mineralogía, composición de los fluidos y afecta a la permeabilidad relativa y perfiles de saturación del yacimiento (Anderson, 1986).

Cuando la fase mojante avanza el ángulo de contacto es mayor y a este fenómeno se le llama imbibición y si la saturación del fluido no mojante aumenta se le nombra drene.

La viscosidad es una medida de la resistencia que presenta un fluido ante un esfuerzo para ser movido, y se mide como el tiempo que el fluido tarda en descender en condiciones de gravedad a través de una restricción calibrada su unidad es el centipoise. Es dependiente de la presión y temperatura, así que a mayor temperatura del fluido menor es su viscosidad.

La porosidad absoluta ( $\phi$ ) es el volumen de los espacios no sólidos que conforman la roca y es el cociente del Volumen poroso ( $V_p$ ) y el volumen de la roca, donde  $V_p$  es la diferencia entre el volumen de la roca y el volumen de la matriz.

La máxima porosidad que se puede encontrar es de 47.6%, la cual solo se daría en un arreglo cúbico perfecto.

La saturación de un fluido es la fracción que el fluido ocupa en el espacio poroso,

y está definido como:  $S_f = \frac{V_f (\text{Volumen del fluido})}{V_p (\text{Volumen poroso})}$  (Ec. 3)

Donde:

$S_f$ : Saturación del fluido

$V_f$ : Volumen del fluido en el volumen poroso

$V_p$ : Volumen poroso.

Debido a que los yacimientos cada vez son más pequeños o difíciles y costosos de explotar, se debe trabajar en los yacimientos que se tienen con el objetivo de incrementar el factor de recuperación (FR), que representa el porcentaje de petróleo y gas que se logra obtener o que se pretende extraer al final de la vida de un yacimiento.

$$FR = \frac{N_p}{N} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

$N_p$ : Volumen de aceite recuperado

$N$ : Volumen de aceite original

$N_p$  y  $N$  se encuentran a condiciones de superficie.

#### 1.4.3.2 Métodos de recuperación mejorada de hidrocarburos (EOR)

Dentro de los métodos de recuperación mejorada se encuentran: Químicos, Térmicos, Gases y otros

- 1) Químicos: Se invade al yacimiento con químicos (surfactantes, polímeros, cáusticos) de tal forma que cambien sus propiedades físicas y permita la extracción del aceite. Representan menos del 1% de recuperación terciaria que se realiza. Estos procesos se caracterizan por el alto costo, la tecnología es compleja y de alto riesgo. (Sheng, 2011). Entre los más comunes se tiene:

- Métodos miscibles (solventes, CO<sub>2</sub>, microemulsiones)

- Métodos de baja tensión (surfactantes)
  - Métodos alcalinos
  - Inyección de agua viscosa (polímeros)
  - Combinación de los tres últimos (ASP)
- 2) Térmicos: Consisten esencialmente en inyectar energía y agua en el yacimiento, con el fin de reducir la viscosidad del crudo. Empleados en aceites con una gravedad menor de 20<sup>o</sup> API y viscosidades de 200 a 2000 Centipoise (combustión In-Situ, inyección continua de vapor, inyección cíclica de vapor “Huff and Puff”, vapor o agua caliente). Estos métodos bajan la tensión interfacial, solubilizan la interface agua-aceite, emulsifican. En campos muy profundos no es aplicable la inyección de vapor debido a las pérdidas de temperatura entre la superficie y el fondo del pozo, lo que impide que el vapor llegue al intervalo que se va a inyectar. Si el campo es muy profundo solo se logra inyectar agua caliente o tibia, debido a dichas pérdidas de temperatura.
- 3) Gases: un solvente se mezcla por completo con el aceite remanente, así supera las fuerzas capilares e incrementa la movilidad del petróleo, los solventes utilizados son gas licuado de petróleo, nitrógeno, dióxido de carbono, gas combustible principalmente N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, y alcohol. En cuanto al CO<sub>2</sub>, es inyectado para alcanzar miscibilidad con el aceite en el yacimiento, se mezcla con el petróleo del subsuelo lo que reduce su viscosidad y aumenta su movilidad. Después de que se tiene la mezcla, el fluido es desplazado generalmente por medio de agua. Para el uso de este gas como método de recuperación mejorada se requiere 10 MMpc de CO<sub>2</sub> para recuperar un barril de aceite, es decir grandes fuentes de emisión CO<sub>2</sub> que se encuentren cercanas a las zonas de explotación petrolera.
- 4) Otros procesos: Eléctrico, Lixiviación Química, Microbiano (MEOR).

Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), es el objeto de estudio de este trabajo. La recuperación terciaria permite obtener de un 5 al 15% del aceite residual del yacimiento (Green y Willhite, 1998).



## **CAPITULO 2: ANTECEDENTES**

### **2.1 Recuperación de Hidrocarburos mediante bioproductos**

Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR): Esta técnica de recuperación en yacimientos de aceite fue sugerida por Beckman en 1926, algunos experimentos y patentes se desarrollaron en 1947 por ZoBell. Se basa en el uso de microorganismos y sus productos metabólicos o bioproductos, consiste en estimular a los microorganismos presentes en el yacimiento, para que produzcan bioproductos, con el fin de incrementar la producción de aceite residual.

Otra estrategia es la inyección de bioproductos que tienen actividad surfactante, que provocan la reducción de la tensión interfacial (Marshal, 2008).

La tecnología MEOR es muy amplia y puede ser diseñada a diferentes y selectivas aplicaciones como son (Hitzman, 1988):

- Estimulación de un pozo
- Inyección de agua con MEOR
- Remoción de parafinas
- Modificación de la viscosidad
- Modificación de aceites pesados
- Desviación del agua

En cada una de estas aplicaciones propuestas pueden emplearse diferentes cultivos microbianos con ciertos requisitos para su implantación y crecimiento en el yacimiento, así como de las condiciones del yacimiento como son la temperatura, presión, pH, porosidad, salinidad, nutrientes disponibles y existencia de microorganismos indígenas (Banat, 1995).

Se tienen reportes de trabajos con éxito en procesos de recuperación de aceite vía microbiana con temperaturas y presiones altas como han sido 95 °C con  $2 \times 10^4$  kPa, en el campo Forties en el Mar del Norte, y 125 °C con  $5 \times 10^4$  kPa en el

campo Ninian (Comeottra y Makkar, 1998), por lo que esta tecnología puede ser empleada de forma exitosa en yacimientos mexicanos.

### **2.1.1 Mecanismos de MEOR**

Los microorganismos producen algunos bioproductos similares a los usados en métodos convencionales de EOR, para movilizar el aceite que se encuentra atrapado en el yacimiento y así incrementar la recuperación de crudo (Bryant, et al., 1998).

Los mecanismos de la recuperación microbiana (MEOR) son:

- Las bacterias producen gases:  $N_2$ ,  $CO_2$  y  $CH_4$ , los cuales reducen la viscosidad y minimizar la tensión superficial e interfacial, favoreciendo la salida del petróleo de los poros y arrastran los residuos que taponan los poros de la roca.
- Las bacterias producen detergentes o agentes emulsificantes que reducen la tensión superficial e interfacial entre el petróleo y el agua, cambian la mojabilidad y liberan el petróleo del medio poroso.
- La fermentación microbiana produce solventes como etanol, propanol, y butanol, que mejoran la movilidad del aceite, ya que minimizar la tensión superficial e interfacial. También se producen ácidos orgánicos, que provocan la disolución de la roca y reducen la tensión interfacial.
- La biomasa y producción de polímeros: Modifican el flujo pasando de las zonas de alta permeabilidad a las de media o baja permeabilidad incrementando la eficiencia de barrido. Esta selección de zonas se obtiene por la producción de biomasa lograda por la inyección de microorganismos al yacimiento con nutrientes. La acumulación de biopolímeros insolubles bloquean canales de flujo aislando zonas invadidas por agua.

Los mecanismos microbianos que se utilizan para la recuperación de aceite se muestran en la siguiente tabla 4 (Donaldson, 1989).

**Tabla 4.** Efecto de los Bioproductos sobre el aceite

<b>Bioproducto</b>	<b>Efecto</b>
Ácidos	Mejora la porosidad y permeabilidad Reacción con rocas calcáreas y produce CO <sub>2</sub>
Biomasa	Taponamiento Modificación de superficies solidas Degradación y alteración del aceite Reducción de la viscosidad del aceite Desulfuración del aceite
Gases ( CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> )	Represurización del Yacimiento Expansión del aceite Reducción de la viscosidad Incremento de la permeabilidad debido a la solubilización de las rocas carbonatadas por CO <sub>2</sub>
Solventes	Disolución de aceite
Agentes de superficie activa	Reducción de la Tensión Interfacial Emulsión
Polímeros	Control de Movilidad Taponamiento selectivo

### **2.1.2 Bioproductos**

Las bacterias durante el proceso de fermentación de sustratos carbonados generan bioproductos que favorecen la recuperación de aceite residual.

Algunos bioproductos de origen microbiano son moléculas de superficie activa tales como los biosurfactantes. Los bioproductos provocan la reducción de la tensión interfacial y superficial.

Los bioproductos como los biosurfactantes son moléculas biológicas con propiedades tensoactivas y emulsificantes, que favorecen la movilidad del hidrocarburo a través del medio poroso, por lo que es factible aplicarlos en el yacimiento para alcanzar mayor recuperación de aceite pesado (Rodríguez et al., 2006).

Los biosurfactantes presentan varias ventajas con respecto a los surfactantes químicos, dentro de las cuales se encuentran: son más estables que otros productos de origen microbiano, se pueden utilizar en un amplio rango de temperaturas, pH, concentración de sales y no impactan el ambiente, biodegradables y tienen baja toxicidad (Jiménez-Islas, 2010).

Los bioproductos son moléculas que contienen un segmento liposoluble y otro hidrosoluble. La solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al bioproducto ocupar la interface existente entre el aceite y la salmuera y así disminuir la tensión interfacial que existe entre ellos, incrementando la movilidad hacia las zonas preferenciales de flujo (Stoyanov et al., 2003). Estos compuestos tienen un amplio rango de estructuras químicas incluyendo péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, lipopéptidos, entre otros (Christofi and Ivshina, 2002)

Los biosurfactantes se han producido por diferentes microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, utilizando diferentes fuentes de carbono (Youssef et al., 2009).

Bioproductos como la surfactina en diferentes estudios han demostrado la capacidad de reducir la tensión interfacial y superficial (Amani et al., 2010).

La biomasa también es considerada un bioproducto, por lo que se ha utilizado para solucionar el problema de depositación de parafinas. Van Hamme et al., 2003; Spormann y Widdel, 2001, utilizaron microorganismos degradadores de hidrocarburos que fueron inyectados en pozos junto con nutrientes para estimular el crecimiento in situ y los microorganismos degradaron algunas cadenas de parafinas, lo que resolvió el problema de depositación de parafinas, además se incrementó la producción de aceite

Se ha reportado que *Pseudomonas* y *Bacillus* sp. Aislados del campo Liaohe en China crecieron utilizando parafina como única fuente de carbono, degradando así las parafinas depositadas (He et al., 2003), las bacterias en condiciones aerobias degradaron 88% de sólidos o semisólidos de parafinas, mientras que las anaerobias facultativas sólo el 47% (Lazar et al., 1999). Otras cepas que han mostrado ser degradadoras de alcanos son *P. aeruginosa*, *B. Licheniformis*, *Acinetobacter* sp. (Kotlar et al., 2007).

De un campo petrolero de Japón se aisló *Petrotoga* sp. AR80 una cepa anaerobia termófila degradadora de aceite, la cual degradó cadenas de hidrocarburos dando lugar a una baja viscosidad de aceite en un 51.6%, 46.3% y 65.9%, esta cepa mostró tal efecto en temperaturas de 50 °C a 70 °C, y fue evaluada también en aceites de Oman, China y Canadá lo que muestra que esta cepa puede ser utilizada en MEOR en un amplio rango de yacimientos (Purwasena et al., 2011).

El taponamiento selectivo por la biomasa producida por los microorganismos es uno de los mecanismos que incrementa la eficiencia de barrido en yacimientos fracturados, tal es el caso de *Bacillus licheniformis* una cepa aislada de suelos contaminados de Oman, que se evaluó en núcleos de caliza fracturados, después de 11 horas de incubación en el núcleo se recuperó de un 27-30% de aceite (Al-Hattali et al., 2012).

En la tabla 5 se muestran algunos microorganismos productores de bioproducto y el mecanismo que ocurre en el yacimiento para incrementar la recuperación de aceite de acuerdo al problema que se presente en el mismo (Youssef et al., 2009).

**Tabla 5.** Microorganismos y efecto de los bioproductos en yacimientos petroleros

<b>Bioproducto</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Problema</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Tipo de formación o fluido</b>
Gases (CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> )	Bacterias fermentadoras y metanógenas	Aceite pesado	Reducen viscosidad	Aceites pesados
Ácidos	Bacterias fermentadoras	Baja porosidad, bajo drene, daño a la formación por aceite pesado	Disuelve minerales carbonatados o depositados	Yacimientos carbonatados
Solventes	Bacterias Fermentadoras	Aceite pesado, baja eficiencia de desplazamiento	Reductor de viscosidad Cambio de mojabilidad	Aceites pesados (API<15), mojado por aceite, yacimientos fluidos por agua
Emulsificantes	<i>Acinetobacteria</i> sp., <i>Candida</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	Deposición de parafinas y baja eficiencia de desplazamiento	Emulsión de aceite de la forma o/w(difícilmente w/o)	Aromáticos (>C <sub>22</sub> alcanos); aceite parafínico y formaciones con asfáltenos.
Biosurfactantes	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. <i>Rhodococcus</i> sp.	Escasa eficiencia de desplazamiento	Disminuye la tensión interfacial	Areniscas o carbonatos, con temperaturas (<50 °C), Aceites >25° API
Biomasa / Producción de polímeros	Varios tipos	Baja eficiencia de barrido volumétrico	Taponamiento de canales con flujo de agua, reducción de permeabilidad en regiones barridas por agua.	Yacimientos estratificados con variaciones en las permeabilidades

### 2.1.3 Trabajos realizados con Bioproductos

En los últimos años se ha evaluado en diferentes proyectos de campo la tecnología MEOR. De julio de 2007 al 2010 se han hecho 106 aplicaciones de tecnología MEOR en Norte América con un éxito del 90%, (Zahner et al., 2011).

Existen reportes sobre el efecto de algunos bioproductos utilizados individualmente sobre hidrocarburos ligeros como hexadecano, queroseno, entre otros.

Los métodos MEOR han sido aplicados a yacimientos con aceites con alta gravedad API como son de 41 grados en el yacimiento Devonian Sandstone en Canadá, y en aceites pesados como 16 °API en el yacimiento Upper Topanga en California, Sparky en Canadá. La tecnología MEOR ha sido exitosamente probada en temperaturas muy elevadas como 200 °F y salinidades altas tales como 140,000 ppm. Además se ha implementado en yacimientos con doble porosidad con buenos resultados.

En diferentes pozos en el yacimiento Upper Topanga, California, se observó un incremento de producción y además una disminución de la concentración de ácido sulfúrico de marzo de 2009 a agosto de 2010, aplicado la tecnología MEOR. (Zahner, 2011).

La tabla 6 presenta algunos tratamientos recientes a diferente escala utilizando MEOR.

**Tabla 6.** Aplicaciones recientes de MEOR a diferentes escalas

Tecnología MEOR	Microorganismo	Tipo o nivel de sistema	Observaciones	Referencia
Inyección de nutrientes	Indígenas	Campo Beverly Hills, 22-26 °API, producción de aceite 20 bl/d y 95 bl/d de agua antes del tratamiento	Después de 6 meses se tuvo una producción de aceite de 82 bl/d y de agua 80 bl/d	Zahner et al., 2011
Inyección de nutrientes	Indígenas	Campo Big Weells, Dimmit Texas, yacimiento San Miguel, k=40 mD, $\Phi=0.2$ , $\mu=2.5$ cp, 33 °API, 81 °C, Corte de agua de 55%	Corte de agua de 35%, incremento en producción de aceite en 88%	Folami et al., 2012
Inyección de bioproductos	Aerobios	Columna empacada, k=5.56 D, $\Phi=0.32$	Incremento en producción de aceite sobre la inyección de agua de 15-20%	Qin-xian Feng et al., 2012
Inyección de bioproductos	Aerobios	Núcleo de arena, k=7.67 $\mu\text{m}^2$	Incremento del 20% de la eficiencia de desplazamiento	Qin-xian Feng et al., 2012
Inyección de bacterias y nutrientes	Bacterias fermentativas indígenas	Campo Yangsammu, k=1.2 $\mu\text{m}^2$ , $\Phi=0.32$ , $\mu=120$ mPas, salinidad 5592 ppm, 62 °C	Aumento en la eficiencia de desplazamiento e incremento en la recuperación de aceite	Qin-xian Feng et al., 2012
Inyección de nutrientes	<i>Bacillus Subtilis</i> , anaerobias a 40 °C	$\Phi=0.25$ , k=50 mD, 25 °API, 42.5 °C	Recuperación de aceite del 19-35%	Gudiña et al., 2012'



Inyección de bacterias en columna empacada	<i>Bacillus Subtilis</i> , anaerobias a 40 °C	14 días de incubación en la columna empacada, $\Phi=0.37$ $TS_{medio}= 66.4$ mN/m, volumen de aceite original= 88 ml, $Swi= 4.9\%$	Recuperación de aceite con bioproducto 35%, con el control 4%, $TS_{medio}= 30$ mN/m a las 120 horas	Gudiña et al., 2012
Inyección de nutrientes	Petrogoga sp. AR80, aislada del campo Yabase, anaerobia	En laboratorio a 70 °C, salinidad 1%, evaluada en aceites con densidades de 33, 26, 16 °API	Reducción de la viscosidad, degradación de hidrocarburos a altas presiones y temperaturas	Purwasena et al., 2009
Inyección de nutrientes	Bloque Z3 del campo SinopecShengli	Columna empacada	Disminución del 15% en viscosidad, recuperación de aceite de 8.5%.	C. J. Yao et al., 2011
Inyección de bacterias y nutrientes	<i>B. Licheniformis</i> DM-1, <i>E. cloacae</i> XW	0.72 km <sup>2</sup> de área del norte del campoDaqing (China).	Disminución de la viscosidad, mayor recuperación de aceite	Zhang et al., 2010.
Inyección de bioproducto	<i>B. Licheniformis</i> , fuente de carbono: glucosa y sucrosa, condiciones anaerobias	Núcleo de caliza fracturado: $\Phi=0.13$ , $k=200$ mD, 36.51 °API, $\mu=1.77$ cp	Después de 11 horas de incubación se produjo 27-30% de aceite residual	Al-Hattali et al., 2012
Inyección de Glicolípido	<i>Rhodococcus ruber</i> Z25		Eficiencia de recuperación de aceite de 93.88%	C. Zheng et al., 2012
Producción in-situ	<i>B. Subtilis</i>	Núcleo de caliza: $\Phi=0.19$ , $k=4$ mD	Recuperación de crudo 4.5 %	Chang, 2011

## **2.2 Justificación**

La fuente más importante de energía es el petróleo, un recurso no renovable y con gran demanda.

Los yacimientos se han explotado por su energía natural en un principio, y se han buscado opciones para incrementar la recuperación de crudo. Debido a la declinación dada por la producción de aceites medios y ligeros, quedan en el yacimiento crudos pesados que representan una de las reservas más grandes, por lo que es necesario investigar nuevas alternativas para obtener la máxima recuperación de aceite. Los procesos biotecnológicos son una alternativa a utilizar en la industria del petróleo, éstos además de ser eficiente, son menos costosos y tienen un menor impacto al medio ambiente. Para poder ofrecer dichas alternativas, es necesario evaluar diferentes bioproductos que pueden ser potencialmente utilizados en la recuperación de hidrocarburos.

## **2.3 Hipótesis y Objetivos**

### **2.3.1 Hipótesis**

Al menos un bioproducto obtenido a partir de microorganismos, tendrá un efecto positivo sobre la recuperación de hidrocarburos en columnas empacadas y en un núcleo.

### **2.3.2 Objetivo General**

Producir, evaluar y determinar el efecto de bioproductos sobre la recuperación de hidrocarburos.

### **2.3.3 Objetivos particulares:**

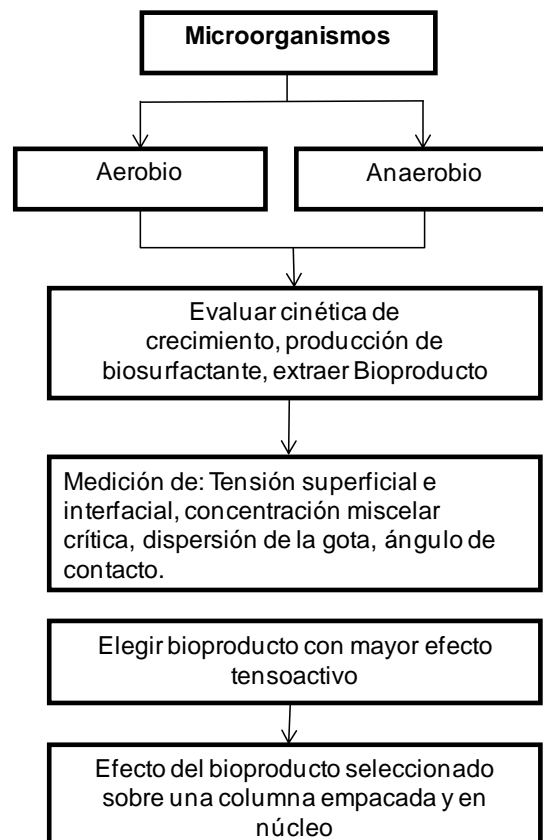
- Evaluar el crecimiento y la producción de biosurfactante de un cultivo mixto anaerobio extremófilo y de dos microorganismos aerobios.

- Separar los bioproductos microbianos y determinar la tensión interfacial, superficial y concentración micelar crítica (CMC).
- Determinar el efecto de los bioproductos sobre el ángulo de contacto y la tensión interfacial, para calcular el número capilar.
- Evaluar el efecto del bioproducto seleccionado en la recuperación de hidrocarburo en una columna empacada y en un núcleo.

### CAPÍTULO 3: Materiales y Métodos

La figura 6 muestra la estrategia experimental utilizada para el desarrollo de este trabajo.

#### 3. 1Estrategia Experimental



**Figura 6.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental para cumplir los objetivos propuestos

## **3.2 Microorganismos**

Para la producción de bioproductos se utilizaron un cultivo mixto anaerobio termófilo y dos cepas puras aerobias (IMP-X y 1486).

### **3.2.1 Cultivo mixto anaerobio termófilo**

El cultivo mixto anaerobio termófilo utilizado proviene de una muestra de aceite pesado de la formación de San Felipe, Veracruz. Este cultivo fue caracterizado por Castorena et al., 2011.

### **3.2.2 Cepas aerobias IMP-X y 1486**

La cepa aerobia IMP-X fue aislada de un sitio contaminado con hidrocarburos de Veracruz, México, la temperatura de aislamiento fue de 30° C. Este microorganismo ha sido reportado como potencial productor de biosurfactante (Roldán et al., 2011).

La cepa aerobia 1486 es una cepa de colección, reportada como productora de biosurfactante de acuerdo al medio en que se cultive.

### 3.3 Medios de Cultivo

#### 3.3.1 Composición del medio para la reactivación del cultivo mixto anaerobio termófilo

El cultivo mixto anaerobio, se encontraba conservado en su medio mineral de crecimiento a temperatura de 4 °C, por lo que fue necesaria su reactivación (crecimiento mediante varios pases del microorganismo en medio fresco), para la evaluación del crecimiento y producción de bioproducto, se utilizó el medio de cultivo que se describe en la tabla 7 (Castorena et al., 2011).

**Tabla 7.** Composición del medio de cultivo para el crecimiento del cultivo mixto termófilo.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaCl	5.0
NH <sub>4</sub> Cl	0.25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.14
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.14
KCL	0.34
Extracto de levadura	2.0
Peptona triptona	2.0
Cisteína-HCl	0.6
C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NNaO <sub>4</sub>	1 mL/L

### 3.3.2 Composición del medio de para la reactivación de las cepas aerobias

Las cepas puras aerobias IMP-X y 1486 se encontraban conservadas en glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por lo que fue necesario su reactivación, se utilizó el medio de cultivo que se describe en la tabla 8.

**Tabla 8.** Composición de los medios de cultivo de las cepas aerobias

Cepa IMP-X		Cepa 1486	
Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
Peptona	4	Sacarosa	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	NaCl	10
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13.6	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	17.4	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.3
Aceite de soya	10 mL/L	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	10.6
		$\text{MgSO}_4$	0.25
		Elementos traza	10 mL/L

### 3.4 Reactivación de los microorganismos

Los microorganismos se encontraban en conservación a temperatura de refrigeración y congelación, por lo que fue necesaria su reactivación.

### **3.4.1 Reactivación del cultivo mixto anaerobio termófilo**

Para la reactivación del cultivo mixto, se prepararon botellas serológicas con 40 mL de medio de cultivo, las botellas se sellaron y esterilizaron.

En campana de flujo laminar se adicionaron 0.3 mL de  $\text{NaHCO}_3$  al 10% con el propósito de mantener el pH aproximadamente en un valor de 7.

Se adicionaron 0.3 mL de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  para mantener la atmósfera reductora. Se agregó una solución de melaza como fuente de carbono para tener una concentración de 5 g/L. Se adicionó 1 mL del cultivo que se encontraba conservado en refrigeración. Se realizó cambio de atmósfera con flujo de  $\text{N}_2$  para mantener las condiciones anaerobias. Las botellas se incubaron a  $70^\circ\text{C}$ , por 24 horas, se evaluó la producción de  $\text{CO}_2$  por cromatografía de gases y el crecimiento por medio de la observación de turbiedad en las botellas serológicas, además se tomó una muestra para su observación al microscopio óptico.

Se realizaron tres pases sucesivos del cultivo mixto como se describió anteriormente, con la finalidad de tener un cultivo activo tanto en la producción de  $\text{CO}_2$  y biosurfactante.

### **3.4.2 Reactivación de las cepas puras IMP-X y 1486**

En matraces de 250 mL que contenían 80 mL del medio de cultivo correspondiente (Tabla 8), se adicionó 1 mL de las cepas conservadas por separado. Los matraces se incubaron en una agitadora orbital Newbruswick a  $30^\circ\text{C}$  y 115 rpm, durante 24 h. Al final del periodo de incubación se tomó una muestra de 1 mL y se determinó su densidad óptica. Se tomó una muestra de 10 mL y se determinó tensión superficial y se midió el halo de la dispersión por la prueba de la gota, para verificar como estaba la actividad de la cepa.

Se realizaron tres pases sucesivos de los cultivos como se describió anteriormente, con la finalidad de tener un cultivo activo estable en la producción de biosurfactante.

### **3.5 Cinéticas de crecimiento y producción de Biosurfactante**

Con el propósito de calcular algunos parámetros cinéticos y determinar el tiempo de máxima producción de biosurfactantes por los microorganismos utilizados, se llevaron a cabo cinéticas.

#### **3.5.1 Cinética con el cultivo mixto anaerobio termófilo**

Se preparó una cinética donde se evaluó el crecimiento microbiano, la producción de CO<sub>2</sub> y la disminución de la tensión superficial (medida indirecta de la producción de biosurfactante).

Se prepararon botellas serológicas de 125 mL con 70 mL del medio de cultivo, se adicionaron las soluciones de en las mismas proporciones que para la reactivación del cultivo. Se adicionó 4.5 mL de melaza para tener una concentración de 5 g/L. Se adicionó 1 mL de inóculo del cultivo reactivado, las botellas se taparon y se realizó el cambio de atmosfera y se incubaron a 70 °C, durante 261 h.

#### **Muestreo:**

Fase gas: se muestreo 0.5 mL de la fase gas para medir la producción de CO<sub>2</sub>.

Fase líquida: se tomó 1 mL de muestra para determinar biomasa medida como proteína, concentración de azúcares y producción de ácidos y solventes.

#### **3.5.1 Cinética con las cepas puras IMP-X y 1486**

Para evaluar la cinética de crecimiento y la producción de biosurfactante, se prepararon 24 matraces con 80 mL de medio de cultivo (tabla 8) para cada una de las cepas. Los matraces fueron inoculados con un 1 mL de la cepa proveniente del 3<sup>er</sup> pase o resiembra. Los matraces fueron incubados a 30°C y 115 rpm.



## **Muestreo:**

El muestreo se realizó retirando 2 matraces cada tiempo definido de muestra (en intervalos de 2 horas durante 72 h y 48 h, para la cepa IMP-X y 1486, respectivamente).

De cada matraz se tomó un volumen de muestra, para determinar el crecimiento microbiano la producción de biosurfactante, se realizó mediante las técnicas de crecimiento microbiano medido como proteína, la producción de biosurfactante por medio de la dispersión de la gota y tensión superficial. Además se evaluó el consumo de sustrato.

### **3.6 Recuperación de hidrocarburos en columnas empacadas y núcleo**

Para probar el efecto del bioproducto elegido sobre la recuperación de hidrocarburos se inyectó una solución del bioproducto seleccionado en columnas empacadas y en núcleo.

#### **3.6.1 Columnas empacadas**

##### **3.6.1.1 Material poroso y acondicionamiento**

Se utilizó para el empaquetamiento de las columnas arena Ottawa, tamizada en mayas 40-50. La arena se lavó con agua destilada, con tolueno y con cloroformo, para eliminar impurezas, se dejó secar por dos días.

##### **3.6.1.2 Columnas**

Se utilizaron tres columnas de vidrio, orientadas de forma vertical con un contenido de arena de 140 g cada una (Fig. 7). El volumen total del empaquetamiento ( $V_r$ ) fue de  $116 \text{ cm}^3$ , el volumen poroso ( $V_p$ ) fue de 32 mL el cual se calculó saturando la columna con agua destilada, la porosidad fue

27.586% (Vp/Vr). Después de calcular la porosidad de las columnas se desempaquetaron y se secó por completo la arena contenida en ellas, se empaquetaron nuevamente y se saturó con 31 ml de aceite con una densidad de 24 °API y una viscosidad de 95.146 mPas, por lo tanto en las columnas no existe saturación de agua residual.

La figura 7 muestra el arreglo de las columnas empacadas e impregnadas con aceite, antes de la inyección del bioproducto.



**Figura 7.** Columnas empacadas e impregnadas con aceite antes de la inyección del bioproducto

A dos de las columnas se les inyectó el bioproducto y a la restante se le fluyó una solución de las sales que contenía el medio en el cual creció el microorganismo aerobio IMP-X (tabla 8). Siendo esta columna un control que representa la recuperación secundaria mediante la inyección de salmuera para poder verificar el efecto del bioproducto en la etapa de recuperación terciaria.

El bioproducto seleccionado se preparó a una concentración de 2,000 mg/L, esto con el propósito de tener una concentración 100 veces mayor que la CMC encontrada, tal como se utiliza a nivel industrial para los surfactantes químicos.

La solución del bioproducto fue inyectada en las columnas empacadas a un flujo de 0.5 ml/min, con este gasto se requieren 62 minutos para inyectar un Vp.

El experimento de recuperación de hidrocarburos en las columnas, se llevó a cabo a una temperatura de 70 °C, para lo cual, se utilizó un recirculador de agua para mantener la temperatura.

### **3.6.2 Núcleo de caliza**

#### **3.6.2.1 Material poroso y acondicionamiento**

Se caracterizó la porosidad y permeabilidad al núcleo con agua bidestilada a condiciones de laboratorio.

El núcleo tuvo un volumen total de 114.01 cm<sup>3</sup>, el volumen de poroso fue de 20.33 cm<sup>3</sup>, por lo tanto su porosidad es de 17.67%. La permeabilidad del núcleo fue de 9.52 mD.

El núcleo se saturó con 11 mL de aceite de 15.2 °API con una viscosidad de 8328 mPas, que representó el 54.1% del volumen poroso y el volumen de saturación de agua fue 9.33 mL 45.9 % (Swr).

#### **3.6.2.2 Condiciones del experimento**

El experimento de recuperación en núcleo de caliza, se llevó a presión de 1500 psi y temperatura de 70°C, evaluando 2 etapas de inyección:

- 1) Recuperación de aceite por inyección de agua bidestilada con gasto de inyección de 5 mL/h
- 2) Recuperación aceite por medio de inyección del bioproducto con un gasto de inyección de 2.5 mL/h hasta que la producción de aceite fuera nula.

La concentración de bioproducto utilizada fue la misma que en las columnas(2,000 mg/L), se inyectó a un gasto de 2.5 mL/h.

## **3.7 Técnicas analíticas**

### **3.7.1 Tinción de Gram**

De las muestras que se observó crecimiento microbiano medido como turbidez, se les realizó tinción de Gram (Madigan et al., 2008).

La tinción de Gram es la técnica de tinción diferencial que tiñe a los microorganismos en función de la composición de la pared celular. Distingue entre dos amplios grupos de bacterias, las Gram negativas, que no retienen el complejo cristal violeta-lugol después de la decoloración aparecen teñidas de rojo, y las Gram positivas que sí retienen el complejo aparecen teñidas de violeta.

Para realizar la tinción se toma una muestra de 15  $\mu$ L de los cultivos en campana de flujo laminar para mantener condiciones estériles, se prepara un frotis colocando los 15  $\mu$ L en un portaobjetos, la muestra se fija con calor moderado sobre la flama de un mechero hasta que se seque, se tiñe la muestra colocando sobre el frotis los siguientes reactivos: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina, dejando actuar por un minuto cada uno enjuagando entre cada adición de reactivos con agua destilada.

La tinción se dejó secar a temperatura ambiente y se observó en el microscopio de contraste de fases (Nikon), modelo Eclipse E8000 con el objetivo de inmersión (100X), adicionando una gota de aceite de inmersión sobre ella.

### **3.7.2 Determinación de biomasa**

La determinación de biomasa, se cuantifico indirectamente por la concentración de proteínas. Se utilizó el método de Bradford (1976). Este método se basa en la unión de un colorante, Azul de Coomassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante en solución ácida existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

### **Curva patrón:**

Se realizó una curva patrón con concentraciones de 5 a 40 mg/L de albúmina de suero bovino (BSA). En tubos de ensaye se agregó 0.5 mL de cada solución, se adicionaron 0.5 mL de la solución Azul de Coomassie y se midió en un espectrofotómetro de UV-visible a una longitud de onda de 620 nm.

### **Muestras:**

Para las muestras, se centrifugó 1 mL de muestra del cultivo durante 10 min a 10,000 rpm, se extrajo el sobrenadante, se adicionó solución salina al 0.85% al botón de células que se formó en el fondo del vial hasta completar el volumen de la muestra original. Se resuspendió en vortex (primer lavado), se realizaron tres lavados. De la última resuspensión se tomaron 300 µL para realizar la hidrólisis de la proteína.

La hidrólisis se realizó colocando 300 µL de muestra en un tubo de ensayo y se agregó 1.2 mL de solución salina al 0.85% y 1.5 mL de la solución de NaOH 0.1 N. Se agitaron las muestras en vortex y se colocaron en baño durante una hora a una temperatura de 85°C.

Al terminar el tiempo de la hidrólisis se adicionaron 0.5 mL de la muestra hidrolizada en un tubo de ensayo y se agregaron 0.5 mL del reactivo de Coomassie la cual de acuerdo a la concentración de (BSA) cambiará el tono de azul de cada dilución.

Se agitaron en vortex y se leyeron en un espectrofotómetro de UV-visible a una longitud de onda de 620 nm. Con la curva patrón de absorbancia vs concentración de proteína, se determinó la concentración de proteína en cada muestra.

### **3.7.3 Determinación de Dióxido de Carbono por cromatografía de gases**

La cuantificación de dióxido de carbono se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases Gow-Mac II, equipado con un detector de conductividad térmica, una

columna CTR 1 y una computadora personal con el programa Clarity Lite para la captura de datos.

Las condiciones del cromatógrafo fueron:

- Temperatura del inyector fue de 45 °C
- Temperatura del detector de 100 °C
- Temperatura de la columna de 25 °C
- Gas acarreador: Helio a un flujo de 65 mL/min.

En estas condiciones el tiempo de retención del CO<sub>2</sub> fue de un minuto.

Se inyectaron 0.5 mL de una muestra de gas, obtenida de la fase gas de los frascos serológicos que contenían el cultivo mixto anaerobio termófilo. Se obtuvo el área de la curva correspondiente al CO<sub>2</sub> y se graficaron los valores del área de cada tiempo medido con el programa, obteniendo así la curva de producción de CO<sub>2</sub> en porcentaje y convirtiéndolo a Moles mediante la ecuación de los gases ideales.

$$n = \frac{PV}{RT} \quad (\text{ec. 5})$$

Donde n son los moles de gas, P la presión absoluta, R la constante universal de los gases ideales, T la temperatura absoluta.

### 3.7.4 Determinación de azúcares totales

El consumo de sustrato se determinó por medio de la evaluación de azúcares totales en soluciones acuosas, se utilizó el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Este método se basa en una valoración colorimétrica de hidratos de carbono que utiliza una disolución de glucosa/sacarosa como patrón (10 a 200 µg mL<sup>-1</sup>). La absorbancia se lee a 490 nm en un espectrofotómetro UV/Vis.

#### **Curva patrón:**

La curva patrón se preparó en concentraciones de 20 a 100 mg/L de glucosa. En tubos de ensayo se colocaron 0.5 mL de cada solución, se adicionando 0.5 mL de

fenol y 2.5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, los tubos se mezclaron en vórtex y se dejaron reposar 15 min. Se construyó la curva patrón de absorbancia vs. Concentración de glucosa.

#### **Muestras:**

En tubos de ensayo se colocaron 0.5 mL de muestra previamente centrifugada, se adicionó 0.5 mL de fenol y 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, los tubos se mezclaron en vórtex y se dejaron reposar 15 minutos. Se midió la absorbancia y con la curva patrón de absorbancia vs concentración de azúcares, se determinó la concentración de proteína en cada muestra.

### **3.7.5 Determinación de solventes y ácidos**

Para determinar solventes y ácidos orgánicos se utilizó un Cromatógrafo de gases HP 6890 con detector de ionización de flama, equipado con una columna capilar AT-Wax, acoplado a un automuestreador y a un sistema de adquisición de datos.

Las condiciones del cromatógrafo fueron:

- Temperatura del inyector 250° C
- Temperatura del detector 250° C
- Temperatura del horno 80°C,
- Helio como gas de arrastre con flujo de 1.7 mL/min.

#### **Curvas patrón**

Se utilizó una solución concentrada (1g/L) mezclando reactivos de alta pureza de acetona, etanol, butanol, ácido acético, propiónico y butírico. A partir de esta solución se prepararon diluciones a concentraciones de 5 a 1000 mg L<sup>-1</sup>. Se transfirió 1 mL de las diluciones preparadas a los viales para cromatografía, se adicionaron 300 µL de ácido fórmico con el fin de pasar a la fase ácida a los ácidos presentes. Cada solución a analizar se inyectó por duplicado al cromatógrafo y se construyó la curva patrón de área vs concentración.

Con este tipo de columna el tiempo de retención de los compuestos fue, para la acetona (5.36 min.), etanol (6.64 min), butanol (11.09 min) ácido acético (17.80 min.), ácido propiónico (18.16 min) y ácido butírico (20.98 min).

### **Muestras:**

Se tomó 1.5 mL de muestra a analizar, se colocó en un vial tipo eppendorf, se centrifugó a 10,000 rpm durante de 10 min., se recuperó 1 mL de sobrenadante y se colocó en un vial de cromatografía, se adicionaron 300  $\mu$ L de una solución de ácido fórmico al 50%, se homogenizó, se taparon y sellaron los viales, y se colocaron en el automuestreador del cromatógrafo para su análisis. Con la curva patrón de área vs concentración, se determinó la concentración de cada uno de los compuestos en las muestras.

### **3.7.6 Dispersión de la gota**

Esta técnica se basa en la modificación de la tensión superficial por presencia de un biotensoactivo. Consiste en esparcir petróleo en una caja petri y medir el diámetro de la zona clara que se produce cuando una gota de una solución que contiene biosurfactante es colocada sobre la superficie de agua-petróleo.

Se colocaron 50 mL de agua destilada en una caja Petri, se agregó sobre la superficie del agua una gota de hidrocarburo (20  $\mu$ L) para formar una capa delgada de hidrocarburo.

Se adicionaron 20  $\mu$ L del sobrenadante donde se encuentra disuelto el biotensoactivo. Se midió el diámetro del halo formado y se consideró como un resultado positivo (Rodrigues et al., 2006)

### **3.7.7 Tensión superficial**

Este método se basa en aplicar la fuerza necesaria para vencer la tensión superficial o interfacial de las muestras analizadas, mediante el desplazamiento vertical de un anillo de platino de composición y geometría precisas; cuando el



anillo se coloca sobre el líquido a medir se ejerce una fuerza máxima vertical que es directamente proporcional a la tensión superficial (Camtel, 2002). Los análisis de tensión superficial se realizaron mediante el método del anillo en un Tensiómetro DuNouy modelo 70545 (fig. 8), a una temperatura de 30 °C. Los microorganismos que producen agentes biotensoactivos disminuyen la tensión superficial del medio de cultivo donde están contenidos.

### **Calibración:**

El tensiómetro DuNouy se debe calibrar antes de medir las muestras, y se verifica midiendo la tensión superficial de una sustancia conocida, en éste caso se comprobó midiendo la TS del agua que es un valor de 72 mN/m, obtenido este valor se procedió a medir las muestras.



**Figura 8.** Tensiómetro DuNouy

### **Muestras:**

Para la medición de la tensión superficial de las muestras, 10 mL del sobrenadante de los cultivos previamente centrifugados, se colocó en una caja Petri de 5 cm de diámetro y se midió la tensión como en el caso de la calibración. Cada muestra se midió por triplicados.

### **3.7.8 Tensión interfacial**

La dilución del bioproducto seleccionado a la concentración de 2,000 ppm fue sujeta a la prueba de la gota pendiente para determinar la tensión interfacial ante la presencia del aceite de 24 °API en roca arenisca berea y en roca caliza Bedford a 70 °C, mediante el método 05 LA-0215-MP-05 Medición de tensión superficial a condiciones de yacimiento por el método de la gota colgante en el laboratorio de recuperación de hidrocarburos del Instituto Mexicano del Petróleo.

Para realizar esta prueba se siguió la siguiente metodología:

- 1) Se añejó la roca en aceite muerto
- 2) Se acondicionó el equipo con el aceite y el bioproducto.
- 3) Se estabilizó a las condiciones de la prueba (presión atmosférica y 70°C).
- 4) Se evaluó la tensión interfacial (toma de imágenes de fotografía).
- 5) Se colocó la roca en el bioproducto a (presión atmosférica y 70°C).

### **3.7.9 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).**

La concentración micelar crítica es la mínima concentración de biosurfactante requerida para obtener la máxima reducción de la tensión superficial e iniciar la formación de micelas (Rammani, 2005).

#### **Preparación de la muestra:**

Para encontrar la CMC fue necesario liofilizar el bioproducto de los microorganismos aerobios, el proceso de liofilización consiste en retirar un solvente, generalmente agua, de sólidos disueltos o dispersados mediante sublimación.

La muestra que contenía el bioproducto disuelto, se centrifugaron durante 10 min a 10,000 rpm (medio, microorganismo, bioproductos), el sobrenadante se colocó en frascos para liofilización y se congelaron. Después de congelar, el producto se

sometió a vacío esto permite al solvente congelado en el producto vaporizarse sin pasar por la fase líquida (sublimación).

Se aplica calor al producto congelado a través de las placas o repisas de la liofilizadora para acelerar la sublimación, las placas de baja temperatura del condensador quitan el solvente vaporizado del compartimiento del vacío convirtiéndolo de nuevo a un sólido en forma de polvo seco, así se repite el proceso hasta completar la deshidratación.

### **Determinación de la CMC:**

Con el polvo obtenido del bioproducto, se determinó la concentración micelar crítica, se preparó una solución patrón a una concentración conocida. A partir de ésta se realizaron diferentes diluciones, a las cuales se les determinó tensión superficial como se describió anteriormente. Cuando se encontró una medición constante en el valor de la tensión superficial, se asumió que ya no había cambio en la tensión por efecto de la concentración de bioproducto. Se construyó la curva de tensión vs. Concentración de bioproducto y en la menor tensión se determinó la CMC en g/L.

### **3.7.10 Determinación del ángulo de contacto y tensión interfacial**

#### **Tensión interfacial:**

La determinación de la tensión superficial o interfacial mediante el análisis de la forma de la gota asimétrica (ADSA) se realizó mediante el análisis de la forma de una gota de un líquido que pende de la punta de una aguja o tubo, o bien que flota cuando la gota del fluido es menos densa que la fase exterior, en este caso se obtiene la gota con una aguja curvada. La imagen de la gota se obtiene con una cámara de vídeo conectada a un ordenador. Estas imágenes se procesan y a partir de ellas se calculan las coordenadas del perfil de la gota. Para ello, se

calibra y se corrigen adecuadamente los datos, ajustándolos a los datos teóricos que proporciona la solución de la ecuación de Young-Laplace

Con el bioproducto seleccionado, a la concentración de 2,000 ppm se realizó la prueba de la gota pendiente para determinar la tensión interfacial en presencia de aceite de 24 °API.

### **Ángulo de contacto:**

El ángulo de contacto se determina depositando una gota de un líquido sobre un sólido o sobre otro líquido no miscible. Se ilumina la gota con luz difusa para producir una imagen de bordes nítidos. La imagen de la gota se proyecta sobre el objetivo de un microscopio que dispone de un goniómetro graduado. El microscopio tiene adaptada una cámara de vídeo que permite reproducir la imagen sobre un monitor.

Para calcular el ángulo de contacto se colocó la roca saturada con aceite y al estar en contacto con el bioproducto, éste recuperó aceite de la roca, a continuación se implantó una gota de aceite y se determinó el ángulo.

### **3.7.11 Determinación de viscosidad**

La viscosidad del aceite como ya fue mencionado en páginas anteriores depende de la presión y la temperatura, si la temperatura se incrementa la viscosidad disminuye, si la presión disminuye la viscosidad también ya que las moléculas del aceite tienen mayor libertad de movimiento.

Se evaluó el comportamiento de la viscosidad del aceite con un viscosímetro SVM 3000 variando la temperaturas de 20 a 100 °C, el viscosímetro cuenta con dos celdas una de densidad y otra de viscosidad, en caso de medir solo algún parámetro se cierra la celda de la propiedad que no se desee utilizar, en este caso se analizaron ambas propiedades. Se colocó en una jeringa 5 mL el fluido a analizar y se conecta a la entrada de una celda la cual lo succionó.

## CAPÍTULO4: RESULTADOS

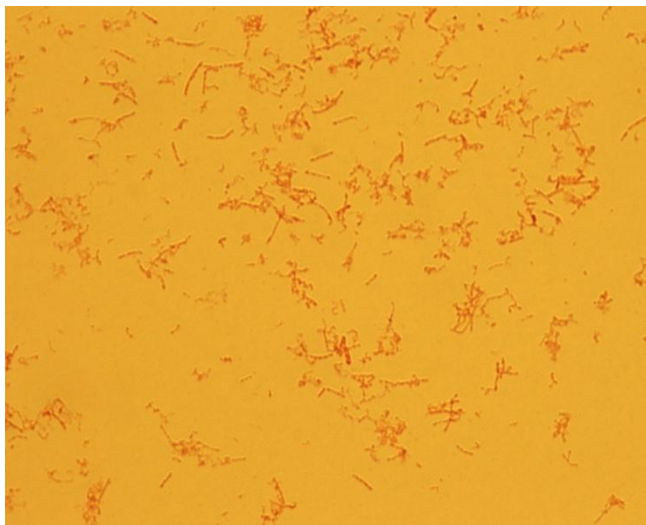
### 4.1 Caracterización microscópica de los microorganismos

Se realizó una observación microscópica de una preparación de gram de los microorganismos utilizados, con el propósito de observar su morfología microscópica y el gram.

#### 4.1.1 Cultivo mixto anaerobio termófilo

La figura 9 muestra los microorganismos observados en el microscopio de contraste de fase en una preparación de tinción de Gram.

Se observan bacterias con morfología de bacilos cortos y largos, bacilos cortos en cadena, Gram negativos y positivos. Esta diversidad morfológica nos habla de una diversidad de especies que se encuentra en el cultivo mixto anaerobio termófilo, lo cual coincide con lo reportado por Castorena et al., 2011, quienes observaron diferentes especies como *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*, *ethanolicus*, *finii*, *brockii*, las termoanaerobacterias que son estrictamente anaerobias y termófilas, crecen en temperaturas de 50 a 80 °C y producen principalmente H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, acetato, lactato y etanol.

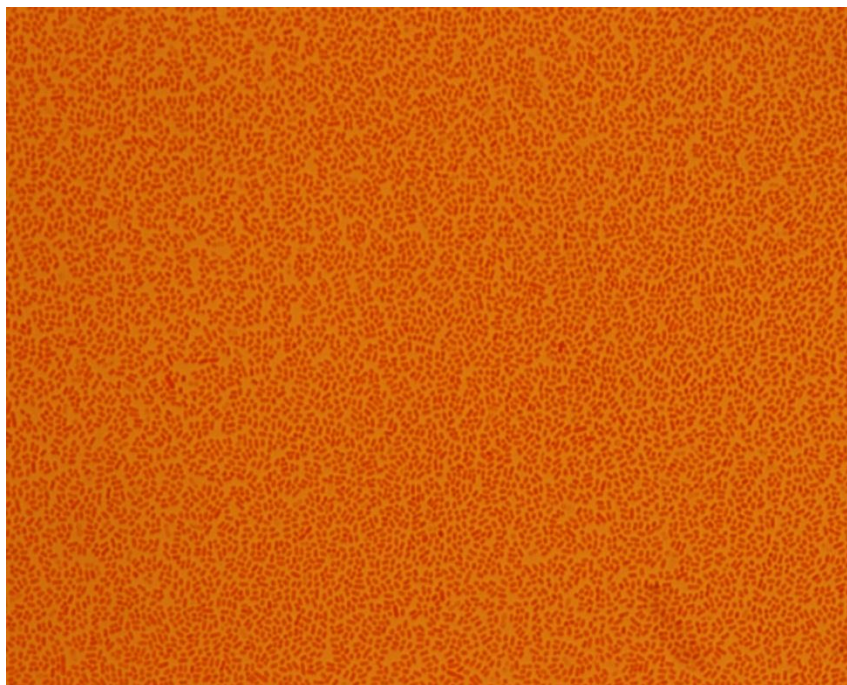


**Figura 9.** Observación en microscopio del cultivo mixto anaerobio, se observa una tinción Gram negativa

#### 4.1.2 Cepas aerobias IMP-X y 1486

La figura 10 muestra la cepa aerobia IMP-X, de la cual se hizo un frotis de la tercera resiembra y se realizó tinción Gram. Se observó al microscopio óptico de contraste de fases, con el objetivo de inmersión. Se observaron cocobacilos gram negativos, aislados.

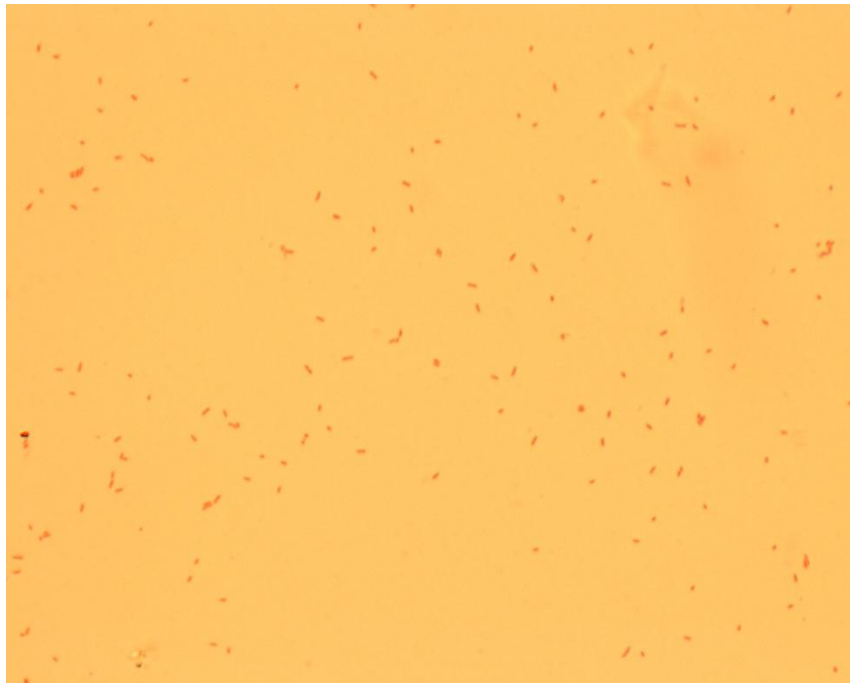
Esta cepa fue aislada de suelos contaminados de hidrocarburos en Veracruz, con una temperatura promedio de 26.1 °C. En laboratorio se ha evaluado la producción biotensoactiva incubada a 30 °C. Se ha obtenido una disminución de la tensión superficial con este bioproducto de 57 Mn/m a 33 mN/m, usando glucosa como fuente de carbono (Roldán et al., 2011).



**Figura 10.** Gram de la cepa IMP-X, los microorganismos presentaron una tinción Gram negativa

La figura 11 muestra la preparación de la tinción de gram de la cepa aerobia 1486, muestra bacilos cortos, gram negativos.

La tinción muestra pocos microorganismos ya que éstos comenzaban a readaptarse al medio y a las condiciones de incubación, debido a la cepa estuvo almacenada en condiciones criogénicas por un gran período de tiempo.



**Figura 11.** La cepa 1486 obtuvo una tinción de Gram negativa.

## **4.2 Cinéticas de crecimiento y producción de biosurfactante**

Para determinar algunos parámetros de crecimiento del cultivo mixto anaerobio termófilo y las cepas aerobias, así como de la producción de biosurfactante, se realizaron cinéticas.

### **4.2.1 Crecimiento y producción de biosurfactante con el cultivo mixto anaerobio termófilo**

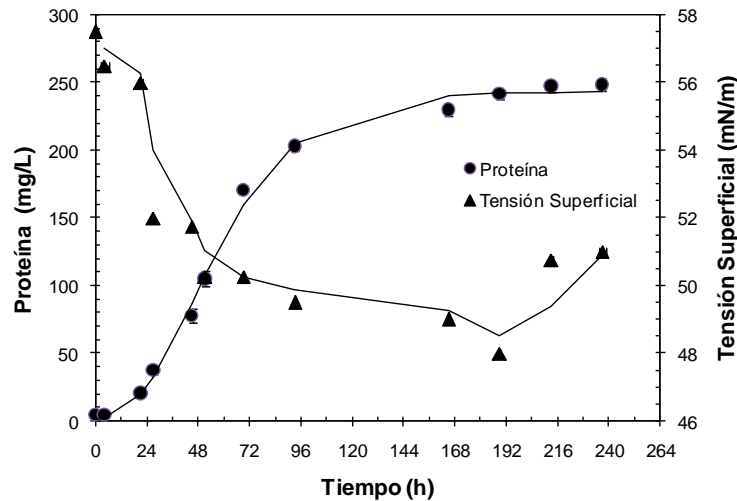
Se calcularon parámetros cinéticos como la velocidad de crecimiento del cultivo mixto, velocidad de producción de CO<sub>2</sub>, velocidad de consumo de sustrato y se evaluó la producción de biosurfactante mediante la disminución de la tensión superficial y la dispersión de la gota.

La figura 12 muestra los resultados correspondientes al crecimiento microbiano, medido como proteína y a la producción de biosurfactante medido como disminución de la tensión superficial.

Los datos experimentales de crecimiento microbiano fueron ajustados con el modelo biológico de Gompertz modificado (Van Ginkel et al., 2001).

En la figura 12 se observa que el crecimiento microbiano empezó a las 24 horas, teniendo el máximo crecimiento a las 189 horas, posterior a este tiempo el crecimiento fue estacionario hasta las 240 horas. Se observa una fase lag o de retardo de 6 horas. Con el modelo utilizado se obtuvo una producción máxima de proteína de 243.15 mg<sub>Proteína</sub>/L (0.243 g<sub>Proteína</sub>/L), la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu$ ) fue de 3.35 mg<sub>Proteína</sub>/L.h (0.08 g<sub>Proteína</sub>/L.d).





**Figura 12.** Crecimiento microbiano (proteína) y Disminución de la tensión superficial del cultivo mixto anaerobio

En cuanto a la producción de biosurfactante medido como disminución de la tensión superficial, se observa que este disminuyó de 57.5 a 48 mN/m en 184 horas (9.5 unidades), posterior a este tiempo la tensión superficial aumentó hasta 51 mN/m al final de la experimentación, lo que significa que el biosurfactante producido por el cultivo mixto fue utilizado como sustrato de los microorganismos.

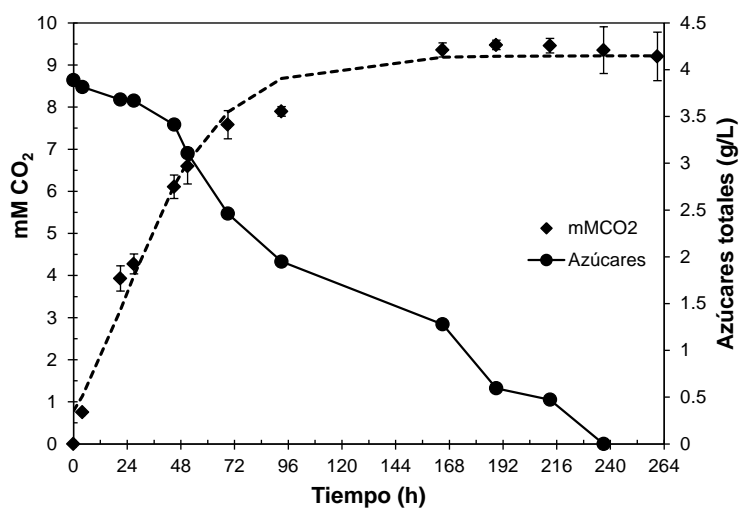
Liu Q. et al., 2005, reportaron que lograron bajar la tensión superficial por medio un biosurfactante producido a partir de cepas facultativas anaerobias, de 16.36 mN/m a 6.49 mN/m, reduciendo 9.87 unidades de tensión, en nuestro trabajo, el cultivo mixto anaerobio redujo en 9.5 unidades la tensión superficial, por lo que se puede observar que son resultados similares.

Se observa que el crecimiento microbiano está asociado con la producción de biosurfactante, ya que a medida que el cultivo mixto crece, disminuye la tensión superficial, y se tiene su máximo crecimiento al mismo tiempo que la máxima disminución de la tensión superficial (189 horas).

#### 4.2.2 Consumo de sustrato y producción de CO<sub>2</sub>

La figura 13 muestra la disminución de la concentración de sustrato (azúcares totales) y la producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo. Los datos experimentales de producción de CO<sub>2</sub>, fueron ajustados con el modelo biológico de Gompertz modificado (Van Ginkel et al., 2001). Se observa que conforme disminuye la concentración de sustrato, aumenta la producción de CO<sub>2</sub>. Se observa que la fase exponencial de producción de CO<sub>2</sub> se llevó a cabo de las 0 a 93 horas, tiempo en el que el consumo de sustrato fue de 4 a 2 g/L, la mitad de la concentración inicial. La producción máxima CO<sub>2</sub> (9.21 mM) se obtuvo a las 165 horas, la cual fue constante hasta el final del experimento (237 horas) y la velocidad de producción fue de 0.135 mM/h.

El consumo total de sustrato se llevó a cabo a las 213 horas, sin embargo se observa que la producción de CO<sub>2</sub> continuó unas horas más, esto debido que para la producción de CO<sub>2</sub> se necesita degradar los azúcares primero a ácidos orgánicos y a partir de éstos se produce el CO<sub>2</sub>.



**Figura 13.** Consumo de sustrato y producción de CO<sub>2</sub> del cultivo mixto anaerobio

### 4.2.3 Tensión superficial y Dispersión de la gota

La figura 14 muestra la disminución de la tensión superficial y el aumento del halo de dispersión de aceite a lo largo del tiempo de experimentación. Estas dos pruebas son utilizadas para determinar la producción de biosurfactante. Se observa que la tensión superficial disminuye de 57.5 a 48 mN/m en 165 h, donde permanece constante. Posteriormente la tensión aumenta a un valor de 51 mN/m hasta el final del experimento, esto pudo deberse a que el biosurfactante producido por el microorganismo anaerobio termófilo fue utilizado como sustrato al haber agotado el sustrato primario (melaza). La dispersión de la gota tuvo un valor inicial de 0.4 cm llegando a un máximo de 0.8 cm en 189 horas, posteriormente al igual que con la tensión superficial, el halo de dispersión de la gota decrece, porque el biosurfactante es utilizado como sustrato.

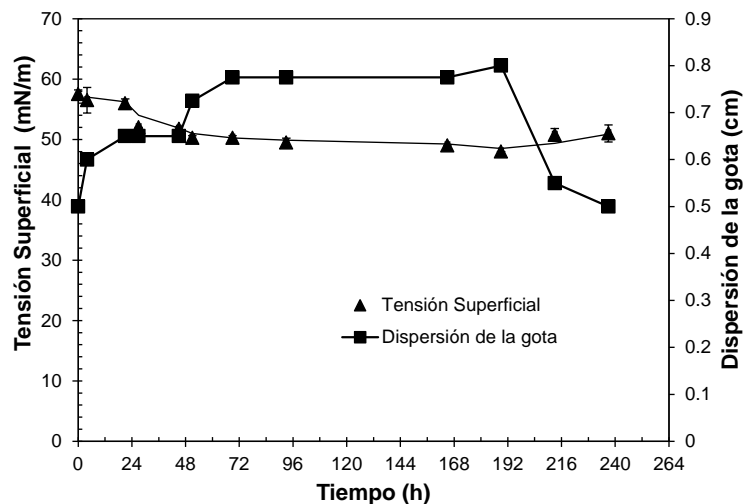


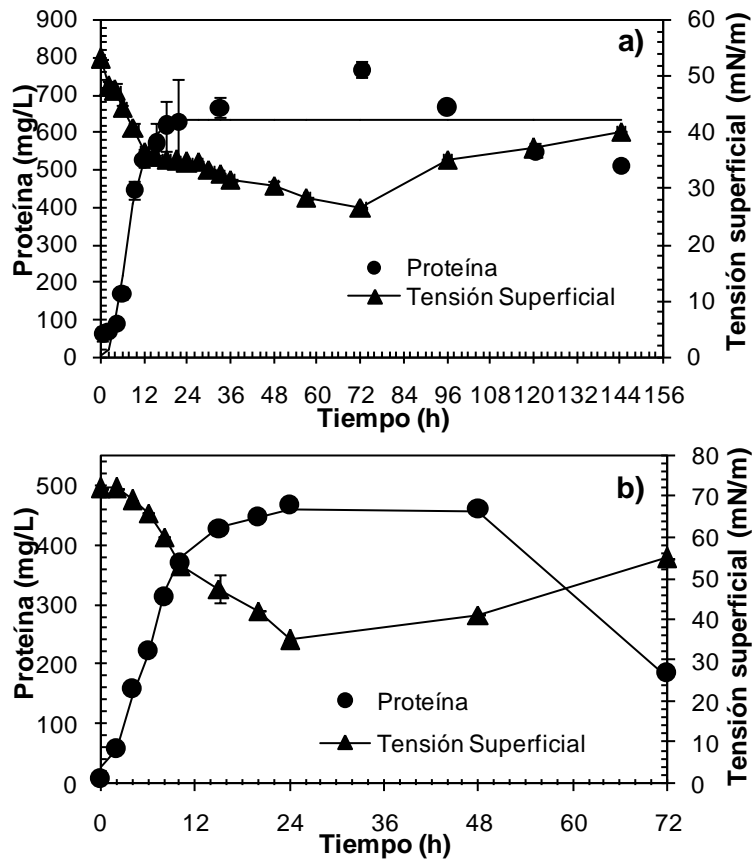
Figura 14. Tensión superficial y dispersión de la gota del cultivo mixto anaerobio

#### **4.2.4 Crecimiento y producción de biosurfactante con las cepas aerobias IMP-X y 1486**

La figura 15 muestra el comportamiento del crecimiento microbiano y la disminución de la tensión superficial, para las cepas IMP-X (fig. 15a) y 1486 (fig. 15b). Se observa en ambos casos que a medida que el microorganismo crece la tensión superficial disminuye, por lo que la producción de biosurfactante está ligada al crecimiento microbiano, tal como ha sido reportado por Akhavan et al., 2005. Además en ambas cepas el crecimiento es exponencial desde las primeras 2 horas y hasta donde ambas tienen su máximo crecimiento.

En la cepa IMP-X, el máximo crecimiento microbiano se obtuvo a las 72 h, con un valor de 767 mg/L de proteína. La tensión superficial (producción de biosurfactante), disminuye paulatinamente hasta las 72 h, punto en el cual se obtuvo la mínima tensión superficial, con un valor de 26.5 mN/m. Después de este tiempo, la tensión superficial aumentó, probablemente por el agotamiento del sustrato y por lo tanto el biosurfactante producido fue utilizado como fuente de carbono.

Con respecto a la cepa 1486 (fig. 15b), se observa que su máximo crecimiento se obtuvo a las 24 horas con un valor de 459 mg/L de proteína y también se tuvo la menor disminución de la tensión superficial con un valor de 35 mN/m. Después de este tiempo el crecimiento microbiano disminuyó y la tensión superficial aumentó por lo comentado anteriormente. Aunque con la cepa 1486 se obtuvo la mínima tensión a las 24 horas, es conveniente utilizar la cepa IMP-X como productora de biosurfactante, ya que tiene una mayor disminución de la tensión superficial. La velocidad de crecimiento para ambas cepas fue de  $0.22 \text{ h}^{-1}$ , no se observó una fase lag en ninguna de las cepas, por lo que estos microorganismos están adaptados al medio de cultivo utilizado.

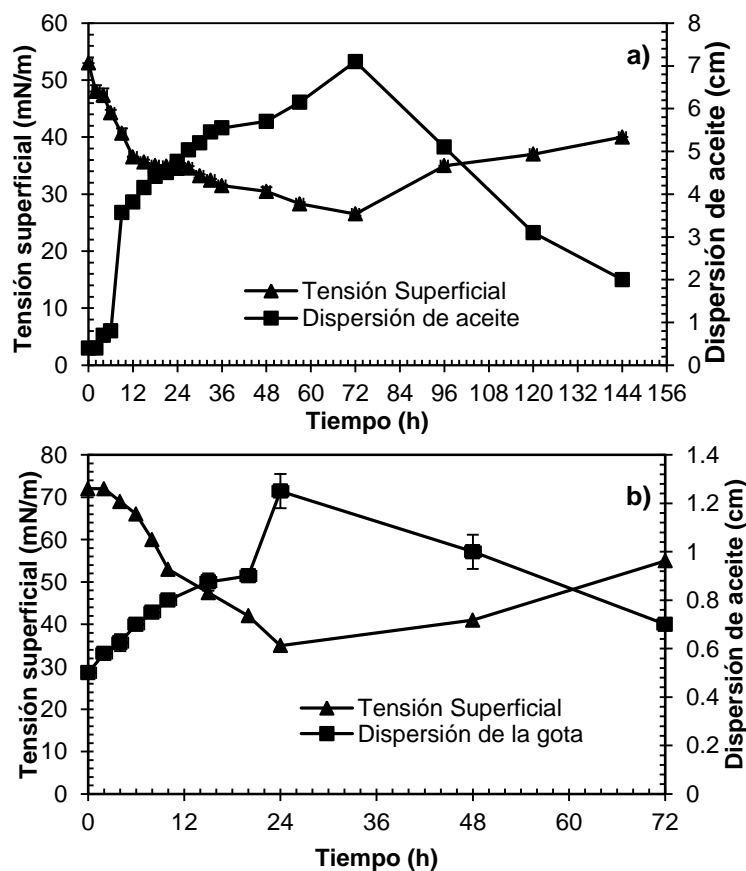


**Figura 15.** Crecimiento microbiano (proteína) y producción de biosurfactante, a) Ceba IMP-X y b) Ceba 1486

En la literatura se encuentra reportado para varios microorganismos aerobios valores de disminución de la tensión, en un estudio de varias especies de bacilos se menciona que el surfactante producido por éstos logró bajar la tensión superficial de 70 a 46 mN/m (Akhavan et al., 2005). El biosurfactante obtenido a partir de *Candida lipolytica* mostró una disminución de la TS del medio de cultivo (55mN/m) a 25 mN/m (Rufino et al., 2012), los ramnolípidos producidos por *Pseudomona Aeroginusa* bajaron la tensión del agua de 72 mN/m a 55 mN/m (Suryanti et al., 2008). Por lo que los resultados encontrados en este trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados.

#### 4.2.5 Evaluación de la producción de biosurfactante por medio de la tensión y el halo de dispersión de aceite con las cepas aerobias IMP-X y 1486.

La figura 16, muestra la evaluación de la producción de biosurfactante por medio de la disminución de la tensión superficial y el aumento del halo de dispersión, se observa las técnicas de evaluación son casi inversamente proporcionales, es decir; a medida que disminuye la tensión superficial el halo de dispersión aumenta. Se observa que el máximo halo de dispersión para la cepa IMP-X (Fig. 16 a) se obtuvo a las 72 horas con un valor de 7.1 cm, en este tiempo también se obtuvo la mínima tensión superficial de 26.5 mN/m.



**Figura 16.** Dispersión de la gota del bioproducto de la cepa IMP-X figura a), cepa 1486 figura b)

Para la cepa 1486, el máximo halo encontrado fue 1.25 cm a las 24 h y su máxima disminución de la tensión fue a 35 mN/m. En la literatura se han encontrado halos

de dispersión en aceites por efecto del biosurfactante producido por *Bacillus Subtilis* PT2 de 9.8 cm de diámetro, y de *Pseudomonas Aeruginosa* SP4 de 12.36 cm (Pornsunthorntawee et al., 2008).

#### 4.2.6 Consumo de sustrato y crecimiento microbiano

La figura 17 muestra el consumo de sustrato y el crecimiento microbiano (proteína) para cepa IMP-X, se observa que a medida que el sustrato disminuye el crecimiento microbiano aumenta, lo que indica que el sustrato es utilizado para la síntesis celular además de la producción de biosurfactante como se observa en la figura 17.

La disminución del sustrato fue proporcional al crecimiento y cuando este tuvo su máximo, se observó que la concentración de sustrato fue cero a las 24 horas. Posteriormente se observa que como ya no había sustrato que consumir el crecimiento microbiano fue decayendo hasta las 72 h, tiempo de duración del experimento.

En cuanto al consumo de sustrato para la cepa IMP-X, no se reporta ya que este no se pudo determinar durante la cinética.

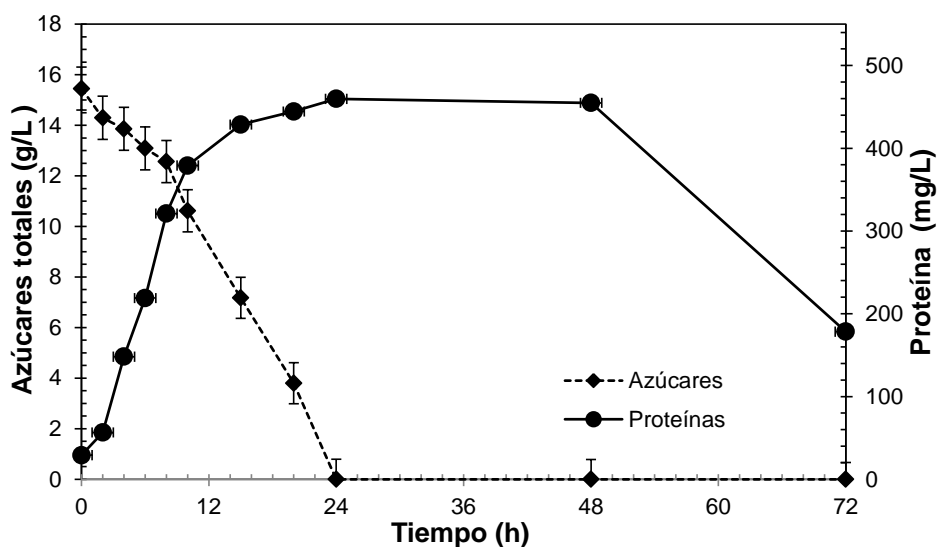
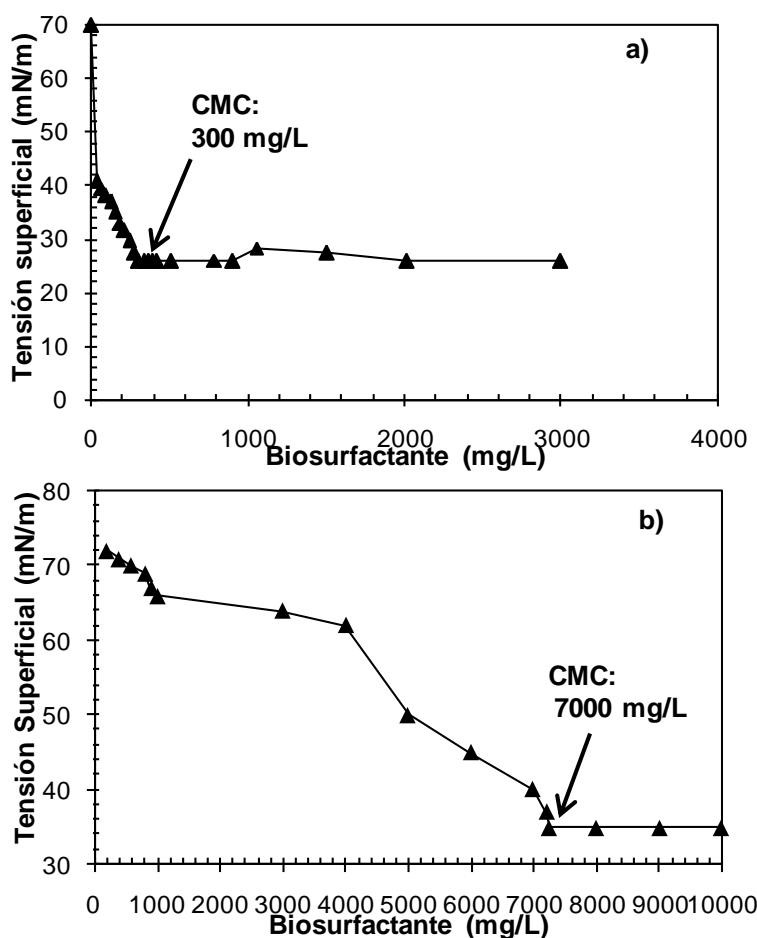


Figura 17. Consumo de sustrato del microorganismo aerobio 1486.

#### 4.2.7 Concentración micelar crítica (CMC)

La concentración micelar crítica es la mínima concentración de un producto con actividad surfactante donde se obtiene la mínima tensión superficial, es la concentración a la cual se forman micelas y que por más soluto que se agregue la tensión superficial se mantiene constante. La figura 18 muestra la disminución de la tensión superficial a las diferentes concentraciones de biosurfactante producido por las cepas IMP-X y 1482.



**Figura 18.** Concentración micelar crítica con el bioproducto, a) de la cepa IMP-X y b) con el de la cepa 1486

Se observa que para la cepa IMP-X la concentración micelar crítica fue de 350 mg/L y para la cepa 1486 fue 7000 mg/L, por lo que el biosurfactante con el

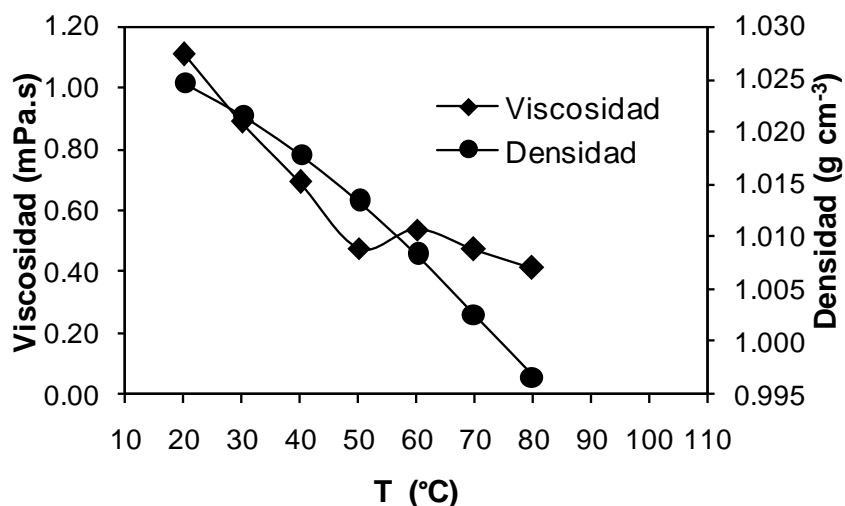


surfactante obtenido para la cepa IMP-X se necesita una menor concentración para disminuir la tensión y por lo tanto es factible su utilización en procesos de recuperación de hidrocarburos para abatir costos. En trabajos realizados con ramnolípidos producidos por *Pseudonoma Aeroginusa* se obtuvo una CMC de 850 mg/L (Suryanti et al., 2008).

### 4.3 Viscosidad del aceite a recuperar y del bioproducto

La viscosidad del aceite como ya fue mencionado anteriormente depende de la presión y la temperatura, si la temperatura se incrementa la viscosidad disminuye, si la presión disminuye la viscosidad también ya que las moléculas del aceite tienen mayor libertad de movimiento.

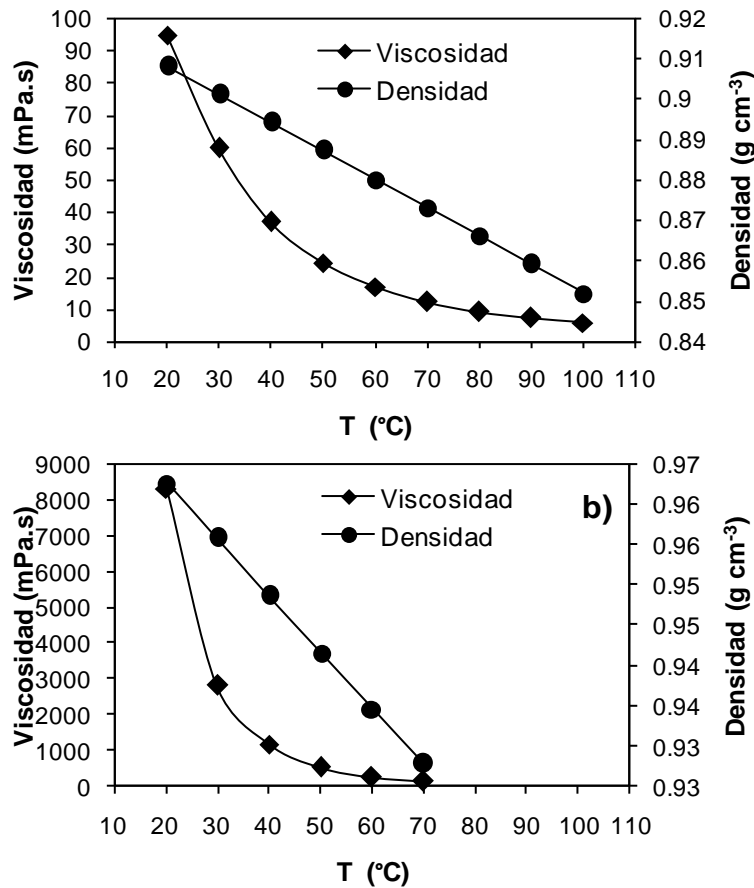
Se midió la densidad y viscosidad del bioproducto que se evaluó en las columnas empacadas para calcular el número capilar, a los 70 °C la viscosidad es 0.47 mPa.s o 0.47 centipoise(fig. 19).



**Figura 19.** Viscosidad y densidad del bioproducto de la cepa IMP-X

Se evaluó el comportamiento de la viscosidad y densidad de los aceites empleados en los experimentos de recuperación tanto en columna y en núcleo, en un rango de temperatura de 20 a 100 °C.

La figura 20 muestra el comportamiento de la viscosidad y densidad de los aceites a recuperar. Se observa que la viscosidad disminuye notoriamente al aumentar la temperatura, a los 20 °C se tienen 95 mPas con una densidad de 0.9080 g/cm<sup>3</sup> y a los 100 °C 5.72 mPas con 0.852 g/cm<sup>3</sup> para el caso del aceite mediano y para el aceite pesado a los 20 °C 8,328 mPas con una densidad de 0.9627 g/cm<sup>3</sup>.



**Figura 20.** Viscosidad y densidad relativa de los crudo a recuperar en a) columnas empacadas y b) núcleo

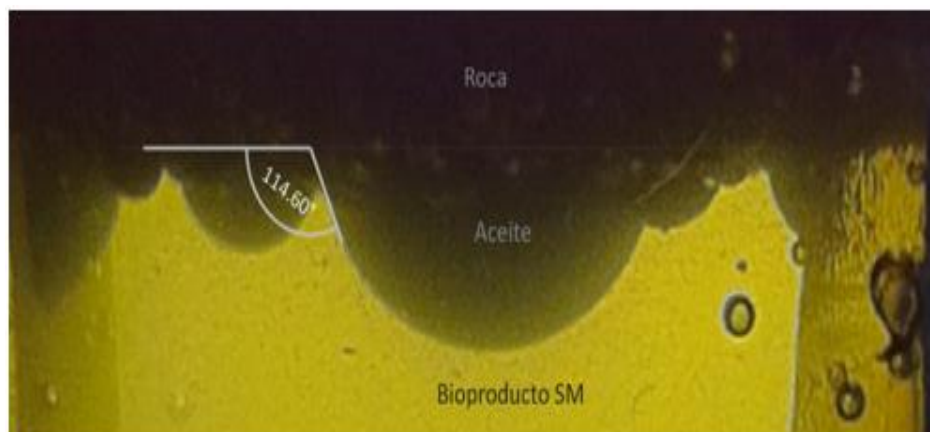
#### 4.4 Determinación de tensión interfacial y ángulo de contacto con el bioproducto de la cepa IMP-X

Las mediciones de la tensión interfacial se llevaron a cabo a 70 °C en un sistema bioproducto aceite mediano y bioproducto aceite pesado. Los resultados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Tensión interfacial del bioproducto a una concentración de 2,000 ppm

Roca Arenisca Berea (aceite mediano)		Roca Caliza Bedford (aceite pesado)	
Tensión interfacial (Dina/cm)	Desviación estándar (+-)	Tensión interfacial (Dina/cm)	Desviación estándar (+-)
8.204	0.255	7.021	0.280
8.459	0.266	7.595	0.345
8.011	0.237	6.275	0.261
8.912	0.259	7.021	0.280
		6.362	0.262
		7.664	0.299

Para la medición del ángulo de contacto se inyectó una gota de aceite en la roca, se reporta un ángulo de 114.6° para el sistema roca-bioproducto a 2,000 ppm-aceite mediano (figura 21).



**Figura 21.** Ángulo de contacto para un sistema Roca-aceite mediano-bioproducto a 70 °C

#### 4.5 Determinación del número capilar y factor de recuperación con el bioproducto de la cepa IMP-X

Para determinar el número capilar por el efecto del bioproducto, se utilizaron los siguientes parámetros:

Viscosidad del fluido desplazante, en este caso la solución del bioproducto: 0.47 mPas o 0.0047 Dina.s/cm<sup>2</sup>.

El volumen total del empaquetamiento (Vr) fue de 116 cm<sup>3</sup>, el volumen poroso se calculó saturando la columna de agua destilada obteniendo un Vp de 32 ml, la porosidad se obtuvo mediante la relación  $\phi = \frac{Vp}{Vr} = \frac{32}{116.99} * 100 = 27.35 \%$

La velocidad del bioproducto se obtuvo utilizando la ecuación de flujo:

$$v = \frac{Q}{A} = \frac{\frac{.5cm^3}{60s}}{6.157536 cm^2} = 0.001353355cm/s$$

Donde  $v$  es la velocidad del bioproducto,  $Q$  el flujo al que se inyecta que es de 0.5 mL/min o 0.5 cm<sup>3</sup>/min,  $A$  es el área transversal de la columna por la que fluye el bioproducto con un diámetro de 28 mm, calculando el área transversal mediante la formula  $A = \pi r^2 = 3.1416(1.4 cm)^2 = 6.157536 cm^2$

La tensión interfacial entre el aceite y el bioproducto fue el promedio de las mediciones registradas 8.3965 mN/m que equivalen a 8.3965 Dina/cm.

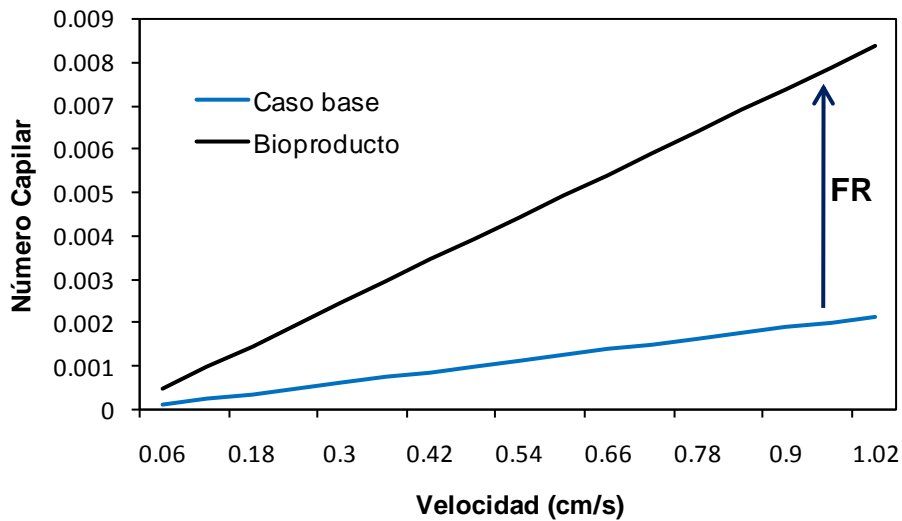
El ángulo de contacto es 114.16°, el coseno de este ángulo es 0.068079157.

Con las variables que se necesitan para calcular el número capilar se sustituyen en la ecuación.

$$Nc = \frac{v\mu}{\sigma \cos\theta} = \frac{(0.001353355 \frac{cm}{s})(.0047 \text{ Dina} \cdot \frac{s}{cm^2})}{(8.3965 \frac{\text{Dina}}{cm})(0.068079157)} = 1.11275E^{-05}$$

El número capilar que se obtuvo no es tan grande; sin embargo si se aumenta la velocidad será mayor. Sí se considera un caso base en el cual el ángulo de contacto permanece constante, variando incrementalmente la velocidad,

considerando la tensión interfacial de la solución salina inyectada en la recuperación secundaria de 42 Dina/cm, su viscosidad de 0.06 Din\*s/cm<sup>2</sup> y se realiza un perfil para el caso base y para el bioproducto de Número Capilar vs velocidades, entonces observamos que se tiene menor NC para la solución salina, debido a que su tensión interfacial es mayor, por lo tanto el factor de recuperación tiende a aumentar en el caso del bioproducto al aumentar la velocidad.



**Figura 22.** Comportamiento del número capilar para una solución salina y el bioproducto

Ryanet., al., 2011 reportan un Número capilar del orden de  $10^{-04}$  después de realizar un proceso de MEOR con la inyección de bioproductos de *Bacillus Mojavensis*.

El factor de recuperación total en este trabajo, a nivel columna fue de:

$$FR = \frac{\text{Volumen recuperado de aceite}}{\text{Volumen original de aceite}} = \frac{12 \text{ ml}}{31 \text{ ml}} = 0.3871 * 100 = 38.71 \%$$

El factor de recuperación obtenido en la columna de recuperación secundaria fue de:

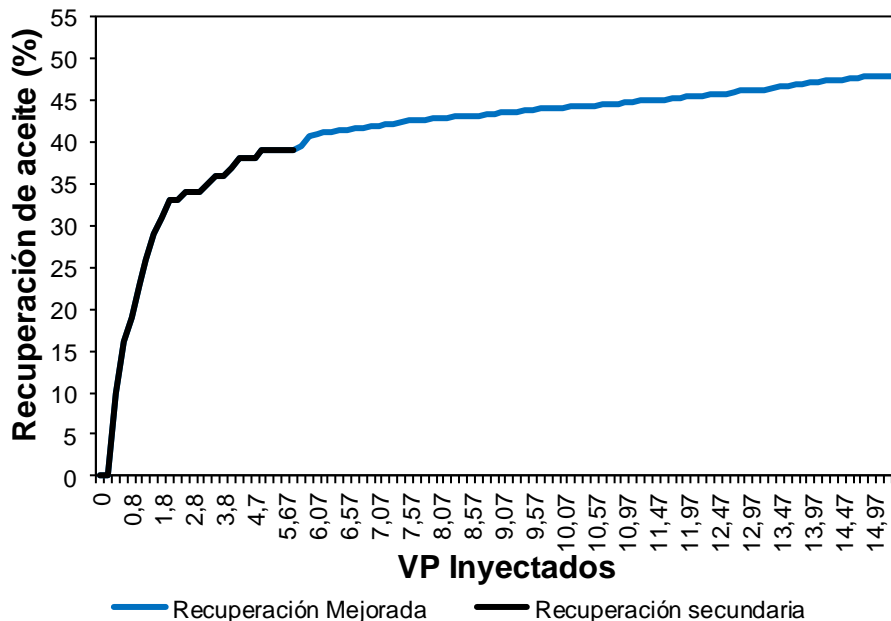
$$FR = \frac{\text{Volumen recuperado de aceite}}{\text{Volumen original de aceite}} = \frac{7 \text{ ml}}{31 \text{ ml}} = 0.22580645 * 100 = 22.58 \%$$

Por lo tanto la recuperación adicional que se tiene en columna empacada en la etapa de MEOR en las columnas empacas fue de 16.13%.

Otros trabajos de recuperación de aceite en columna empacada el bioproducto de *P. Aeruginosa* registró una recuperación de aceite del 14.3%, el bioproducto producido por *B. Subtilis* recuperó el 10.4% de aceite y el de *R. Erythropolis* obtuvo una recuperación del 7.2% (Wen-Jie et al., 2011).

#### 4.6 Recuperación de aceite con el bioproducto de la cepa IMP-X en un núcleo de caliza

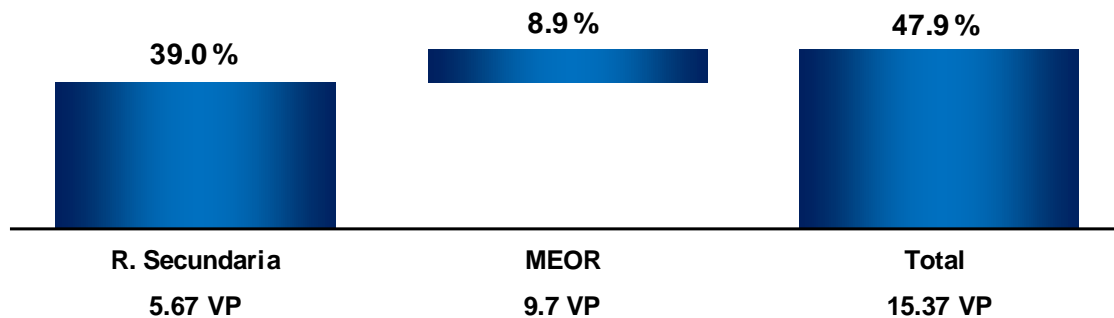
La figura 23 muestra el comportamiento que tuvo el proceso de recuperación secundaria y mejorada vía microbiana en el fragmento de núcleo de caliza con una saturación de 54.1% de aceite pesado y una saturación de agua residual de 45.9%.



**Figura 23.** Recuperación secundaria y mejorada de aceite pesado en núcleo de caliza

Durante la inyección de agua bidestilada se observa un desplazamiento de aceite debido al empuje que genera el agua, a partir del volumen poroso 2.3 se tiene un cambio de pendiente, lo que nos reduce la producción de aceite, ya que el empuje por agua comienza a desplazar simultáneamente aguay aceite, al final de la etapa secundaria se obtuvieron 7.9 mL de aceite, a partir del 5.67 Vp se inyectó el bioproducto que recuperó 1.8 mL de aceite.

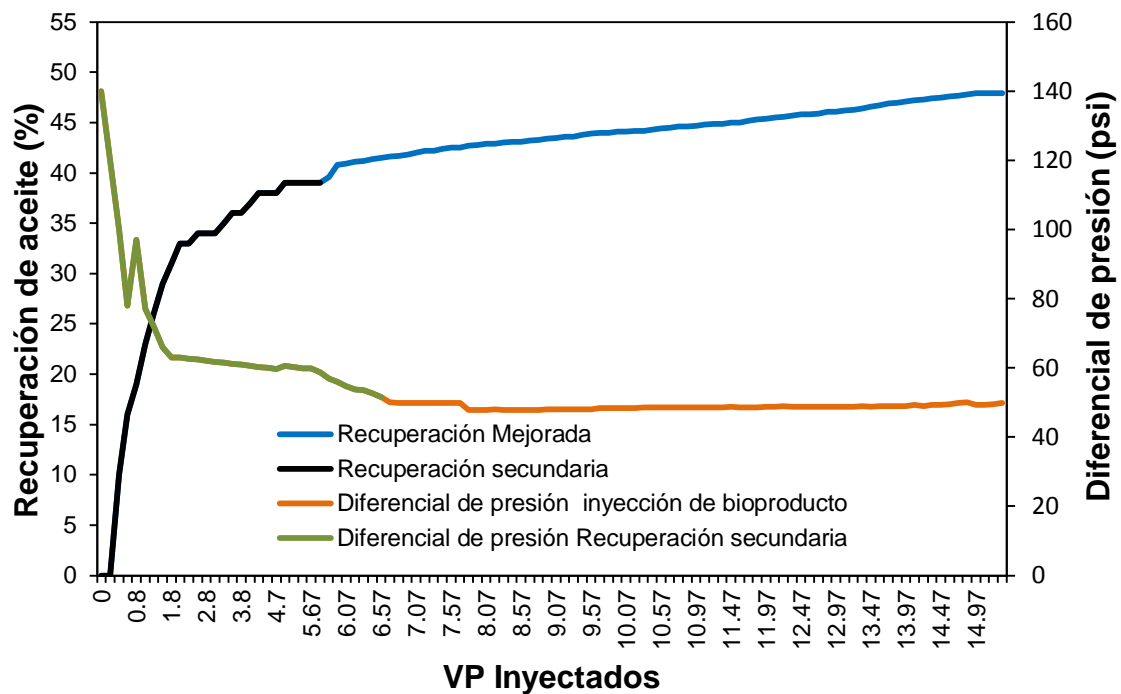
La mayor recuperación de aceite se obtuvo durante la etapa de recuperación secundaria siendo del 39 % (7 mL) a los 5.67 volúmenes porosos inyectados de agua bidestilada, al terminar la etapa de recuperación secundaria se comienza a fluir en el núcleo el bioproducto que logra una recuperación de aceite del 8.9% (1.8 mL) cuando se le han inyectado al núcleo 9.7 VP de bioproducto, al final de todo el proceso se tiene un recuperación de aceite del 47.9% (8.8 mL) como se observa en la figura 24.



**Figura24.** Porcentajes de recuperación de aceite en el núcleo de caliza por recuperación secundaria y efecto microbiano.

El comportamiento de la diferencial de presión durante el proceso de recuperación de aceite en el núcleo de caliza se encuentra en la figura 25, la curva inicia con una diferencial de presión de 140 psi (línea verde) y va disminuyendo ya que se comienza a inyectar un fluido menos viscoso que el aceite que se encuentra en la roca, a partir de la inyección del bioproducto la presión diferencial prácticamente se mantiene estable. También se observa al inicio de la curva de recuperación de

aceite vía microbiana que se necesita cierto volumen poroso para influenciar el sistema (línea azul).



**Figura 25.** Producción de aceite en el núcleo de caliza por inyección de agua bidestilada y bioproducto, comportamiento de la presión diferencial durante el proceso.

Cuando la diferencial de presión aumenta, incrementa la recuperación de aceite debido a que a mayor presión se tiene mayor velocidad del fluido desplazante pero puede generar inestabilidad y que el fluido tome caminos no deseables, si se aumenta la viscosidad se requieren mayores gradientes de presión para dar la velocidad óptima para el fluido desplazante, por lo tanto para aumentar el NC es mejor disminuir la TIF y esto se traduce como menor saturación de aceite residual.

En trabajos similares se reportó que *Bacillus Licheniformis* fue incubada a 45°C y su bioproducto recuperó de un núcleo de caliza con porosidad de 19% el 6% del aceite, y *Bacillus Subtilis* 4.5% (Gao., 2012).



## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

- Se evaluó el crecimiento y la producción de biosurfactante de un microorganismo anaerobio extremófilo y de dos cepas aerobias (IMP-X y 1486).
- Para el cultivo anaerobio extremófilo, se obtuvo una producción máxima de proteína de 243.15 mgProteína/L (0.243 gProteína/L), la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu$ ) fue de 3.35 mgProteína/L.h (0.08 gProteína/L.d).
- Con el bioproducto producido por el cultivo mixto extremófilo, se obtuvo una disminución de la tensión superficial de 9.5 unidades en 184 horas.
- En la cepa IMP-X, el máximo crecimiento microbiano se obtuvo a las 72 h, con un valor de 767 mg/L de proteína. Para la cepa 1486 el máximo crecimiento se obtuvo a las 24 horas con un valor de 459 mg/L de proteína.
- Con los bioproductos obtenidos con las cepas aerobias la tensión superficial (producción de biosurfactante), disminuyó hasta a 26.5 mN/m y 35 mN/m en 72 h, para cepax IMP-X y 1486, respectivamente.
- Después de que obtuvo la máxima disminución de la tensión superficial, se observó que al continuar la cinética de producción de bioproducto (biosurfactante), la tensión superficial aumentó al final de la experimentación, lo que significa que el bioproducto producido tanto por el cultivo mixto y las cepas aerobias fue utilizado como sustrato de los microorganismos.

- La velocidad de crecimiento para las cepas IMP-X y 1486 fue de 0.22 h<sup>-1</sup>, no se observó una fase lag en ninguna de las cepas, por lo que estos microorganismos están adaptados al medio de cultivo utilizado.
- El biosurfactante producido por la cepa IMP-X presentó una reducción mayor de la tensión superficial (26.5mN/m) que los biosurfactantes obtenidos por los otros microorganismos.
- La concentración micelar crítica con los bioproductos obtenidos fue de 350 mg/L por la cepa IMP-X, 7,000 mg/L para la cepa 1486, siendo mejor la obtenida con la cepa IMP-X, por lo que se utilizó para los experimentos de recuperación de hidrocarburos.
- El número capilar obtenido para las columnas empacadas fue de  $1.11275E-05$ , que es un valor en el cual comienza la movilización del aceite en el caso de las columnas empacadas.
- El factor de recuperación para las columnas empacadas fue de 16.3% de incremento con respecto a la recuperación secundaria.
- Se obtuvo una recuperación de 8.9% en un núcleo de caliza por efecto del bioproducto.
- El biosurfactante obtenido con la cepa IMP-X, es potencialmente utilizable en la recuperación de hidrocarburos.
- El cultivo mixto anaerobio y los bioproductos obtenidos tanto del cultivo mixto anaerobio y las cepas aerobias crecen y operan en condiciones de yacimiento.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Se observó que la cantidad de microorganismos y bioproductos responden a la disponibilidad de nutrientes, así como a una población reproductivamente activa al momento de la inoculación, por lo que es necesario mantener la concentración necesaria de nutrientes para que los microorganismos permanezcan activos, por lo que es necesario realizar estudios sobre consumo tanto de sustrato como de los componentes minerales del medio de cultivo.
- Es necesario realizar estudios sobre los parámetros óptimos de crecimiento de los cultivos utilizados (pH, temperatura, salinidad, así como los macronutrientes y fuente de carbono), para saber en qué condiciones se genera más bioproducto.
- Los bioproductos generados por el metabolismo de los microorganismos son interesantes para ser aplicados en la Recuperación Mejorada de Hidrocarburos, además de que su impacto en el ambiente es bajo, sin embargo es necesario realizar pruebas de estabilidad de estos bioproductos para observar su rango de operación.
- Para evaluar el efecto del bioproducto en próximas pruebas se sugiere que el gasto de inyección sea bajo para evitar inyectar grandes volúmenes porosos.
- Las pruebas de laboratorio demostraron que la tecnología MEOR puede incrementar la eficiencia de recuperación de aceites ligeros hasta pesados,

sin embargo es necesario realizar más estudios en función del pozo o campo donde se aplique.

- Se deben de realizar más estudios acerca de los efectos que los metabolitos tienen sobre los yacimientos, y más importante aún que estos estudios se realicen en campo para evaluar de manera más precisa su función, pues de acuerdo a los productos que se generen, se tienen diferentes mecanismos que actúan en los fluidos y en la roca.
- Es importante realizar estudios del efecto de los bioproductos sobre la eliminación de parafinas y asfáltenos que se generan en el pozo, obstruyéndolo y generando un daño.
- Las empresas petroleras deben poner más interés en apoyar la investigación acerca de éstos métodos que prometen generar un incremento en la producción sin dañar el ambiente, quizá sería un avance el poner a disposición de los investigadores pozos petroleros que se encuentren cerrados o con muy baja producción.

## Referencias

- Akhavan A. S., Mazaheri M. A., Saggadian V., Noohi A. (2005). Production of biosurfactant from Iranian oil field by isolated Bacilli. *International Journal of Environmental Science & Technology*, Vol. (1): 287-293.
- Al-Hattali R., Al-Sulaimani H., Al-Wahaibi., Al- Bahry S., Elshafie A., Al-Bemani A., Joshi S. (2012). Improving Sweep Efficiency in Fractured Carbonate Reservoirs by Microbial Biomass. SPE 154679.
- Amani H., Hossein M. S., Haghighi M., Reza M. M. (2010). Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, Vol.(75):209-214.
- Amani H., Hossein S. M., Haghighi M., Reza M. M., Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications.(2010). *Journal of Petroleum Science and Engineering*, Vol. (75): 209-214.
- Amyx, W. J., Bass M. D., Whiting L. R. (1988). *Applied Petroleum Reservoir Engineering- Physical Properties*. New York, McGraw-Hill: 133-139.
- Anderson, William G. (1986). Wettability Literature Survey Part 1: Rock/oil/ brine interactions and the effects of core handling on wettability. *JPT*, 1125-1144.
- Anderson, William G. (1987). Wettability Literature Survey Parte 4: Effects of wettability on Capillary Pressure. *JPT*: 1283-1300.
- Armstrong R. T. and Wildenschild D. Decoupling the Mechanisms of Microbial Enhanced Oil Recovery.(2011). SPE 146714.
- Banat I.M. (1995). Biosurfactans production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, Vol. (51): 1-12.
- British Petroleum.(2011). *Statistical Review of World Energy*.

- Bryant R.S., Bayley S. A., Stepp A. K., Evans D. B., Parli J. A., Kolhatkar A. R. (1998). *Biotechnology for Heavy Oil Recovery*, BDM Petroleum Technology, Vol. (110).
- Campfel. (2002). ASTM Designation: D971-99a Standar Test Method for Interfacial Tension of Oil Against Water Ring Method.
- Castorena C.G., Mayol C. M., Olguín L. P., Reyes A.J., Roldán C.T., Román V.S., Zapata P. I. (2011). Evaluation of indigenous anaerobic microorganisms from Mexican carbonate reservoir with potential MEOR application. *Petroleum Science and Engineering*, Vol. (81): 86-93.
- Christofi N., Ivshina I.B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal Applied Microbiology* (93): 915-925.
- Dake L.P. (2001). *Fundamentals of reservoir engineering*, Elsevier science, Vol (8): 390-399.
- Donaldson E.C., Chilingarian G.V. (1985). *Enhanced Oil Recovery I Fundamentals and analyses*. T.F. Elsevier Publications. Pp: 10-14
- Donaldson E.C., Chilingarian G.V., Yen. (1989). *Microbial Enhanced Oil Recovery* T.F. Elsevier Publications. Pp: 7-10.
- Ekwere J. P. Department of Petroleum & Geosystem Engineering, The University of Texas. 2007.
- Energy Information Administration U.S., *Annual Energy Outlook (2011)*. Early Release Overview.
- Feng Q., Cheng H., Ma X., Dong H., Ting Ma. (2012). Application of a Novel Amylum-Cellulose Nutrient System for Microbial Flooding in Dagang Oilfield China. SPE 150501.

- Folami A., Atinum E&p, Marcotte B., Sheehy A. and Govreau B. (2012). A Texas MEOR Application Shows Outstanding Production Improvement Due To Oil Release Effects On Relative Permeability.SPE: 154216.
- Gao C. H. (2011). Microbial Enhanced Oil Recovery in Carbonate Reservoir: an Experimental Study. SPE. 143161.
- Garaicochea Francisco (1991). Apuntes de Comportamiento de los yacimientos. UNAM. Pp. 25-30
- Green D., Willhite G., (1998). Enhanced Oil Recovery, Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas.SPE Volume (6).
- Gudiña E. J., Rodrigues L.R., Teixeira J. A., Pereira J. F., and Coutinho J. A., University of Aveiro, Soares L.P.(2012). Biosurfactant Producing Microorganisms and its Application to Enhanced Oil Recovery at Lab Scale. Hindawi Publishing Corporation.
- Hamme Van J.D., Singh A., and Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol.Mol. Biol. Rev. 67 (4).
- He Z., She Y., Xiang T., Xue F., Mei B., Li Y., Ju B., Mei H., and Yen T.F. (2003). A pilot test using microbial paraffin-removal technology in Liacheoilfield.Petroleum.Science.Technology, Vol. (21).
- Hitzman D. O. (1988).Review of Microbial Enhanced Oil Recovery Field Tests.Proceedings of the Symposium on Applications of Microorganisms to Petroleum Technology, Conf. 870858, Oklahoma, pp VI-1-42.
- Jiménez I. D., Medina M. S., Gracida R., J. (2010).Revista Internacional de Contaminación Ambiental, Vol. (26):65-84.
- Khire, J. M.; Khan, M. T., (1994).Microbially enhanced oil recovery (MEOR), Importance and mechanism of MEOR, Enz.Microbiol.Tech.Vol. (16): 170-172.

- Kotlar H. K., Wetzel A., Thorne-Holst M., Zotchev S., and Ellingensen T. (2007).
- Lazar I., Voicu A., Nicolescu C., Mucenica D., Dobrota S., Petrisor I. G., Stefanescu M., and Sandulescu L. (1999). The use of naturally occurring selectively isolated bacteria for inhibiting paraffin desposition. J. Pet. Sci. Eng. Vol. (22).
- Makkar R. S, Cameotra S.S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. J Appl. Microbiol Biotechnol, Vol. (50): 520-529.
- Marshall, S. L. (2008). Fundamental Aspects of Microbial Enhanced Oil Recovery. CSIRO Land and Water, pp 1-13.
- Newberry J., Thierry J. (2007). El Petróleo, Ed. COLIHUE, Buenos Aires, pp. 59-60.
- PEMEX. (2011). Las Reservas de Hidrocarburos de México, pp. 25.
- Purwasena I. A., Sugai Y., Sasaki Kyuro. (2010). Estimation of the Potential os an Oil-Viscosity-Reducing Bacterium *Petrogoga* sp. Isolated from an Oil Field for MEOR. SPE 134961.
- Rammani P., S.S. Kumar, R. Gupta, Process Biochem, 2005.
- Rodrigues L. R., Banat I. M., Teixeira J. A., and Oliveira R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. (57).
- Rodríguez M., PEMEX. (2005). Seminario Internacional: Contaminación del Aire en Ciudades de Altura.
- Roldán C T., Martínez X. G., Zapata P. I., Castorena C. G., Reyes A. J., Mayol C. M., Olgún L. P. (2011). Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design, Elsevier. Vol. (86): 386-389.



- Rufino R. D., Luna J. M., Campos-Takaki G. M., Ferreira S. R. M., Sarubbo L. A. (2012). Application of the Biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the Remediation of Heavy Metals. *Chemical Engineering Transactions*, Vol. (27).
- Saidi A. M. (1987). *Reservoir Engineering of Fractured Reservoirs (Fundamental and Practical Aspects)*, TOTAL Edition.
- Sheng J. (2011). *Modern Chemical Enhanced Oil Recovery*. Elsevier. Pp 8-20.
- Spormann A.M., and Widdel, F. (2001). Metabolism of alkybenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*. Vol. (11).
- Suryanti V., Hastuti S., Dwi W. T., Mudasir, Ika M. (2008). Biosurfactants Production by *Pseudomonas aeruginosa* using soybean oil as substrate. *Indo. J. Chem.* Vol. (9): 107-112.
- Wax Control by Biocatalytic Degradation in High-Paraffinic Crude Oils. SPE 106420.
- Xia W., Ping H. D., Yu L., Yu D. (2011). Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. Elsevier, Vol. (392): 124-130.
- Yao C.J., and Lei G.L., Ma J.Y., Zhao F.M., and Cao G.Z. (2011). Experiment and Simulation of Indigenous Microbial Enhanced Oil Recovery. IPTC 14268.
- Youssef N., Mostafa S. E., and McInerney M. I J. (2009). *Advances in Applied Microbiology*. Vol. (66): 194-200.
- Zahner R. L., Tapper S.J., Marcotte B.W. G. (2011). What has been learned from a hundred MEOR applications. SPE 145054.
- Zheng C., Yu L., Huang L. (2012). China National Petroleum Corporation. Microbial- Enhanced Treatment of Oil Sludge From Oil- Production Plants Using *Rhodococcus ruber* Z25, *Journal of Canadian Petroleum Technology*, Vol. (81): 49-56.

