

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS
PROVENIENTES DE UN POZO PETROLERO PARA LA
RECUPERACIÓN MEJORADA DE HIDROCARBUROS VÍA
MICROBIANA**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

PRESENTA

VIRIDIANA MORALES RAMÍREZ

DIRECCIÓN: M. EN C. ANA MARÍA MUÑOZ COLUNGA

CO-DIRECCIÓN: DR. FEDERICO TOVAR ROJO

México D.F., Marzo 2010



El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la asesoría de la M. en C Ana María Muñoz Colunga.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.,
por la formación profesional brindada.

Al Instituto Mexicano del Petróleo,
por la oportunidad de participar en el proyecto.

A mi directora de tesis M. en C. Ana Muñoz,
por sus sugerencias, paciencia, apoyo
y conocimientos transmitidos.

A mi codirector Dr. Federico Tovar, y mis sinodales:
Dra. Angélica Salmerón, M. en C. Haydeé Hernández y
M. en C. Oswaldo Ramos, por sus comentarios
y aportaciones a este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Armando y Yolanda, por su apoyo, comprensión
e infundir en mí el sentido de la responsabilidad
y la motivación a superarme día con día:
Gracias.

A mi hermana Tania por su tolerancia y apoyo en este largo camino,
por ser una de las personas más importantes en mi vida
y por tratar de ser un buen ejemplo para ti.

A Alex, por su paciencia y constante apoyo
para sacar adelante este trabajo,
te amo.

A Diana, por su amistad, apoyo y ayuda incondicional
durante todos estos años, con cariño.

A mi familia, con cariño.

A todos mis amigos.

INDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	3
2. GENERALIDADES	4
2.1 Yacimientos y métodos de recuperación de hidrocarburo	4
2.2 Recuperación mejorada de hidrocarburo vía microbiana	5
2.2.1 Mecanismo de aplicación en campo	5
2.3 Reseña histórica sobre la recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana	6
3. MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE MEOR	9
3.1 Microorganismos que pueden mejorar la recuperación de hidrocarburo	9
3.1.1 Microorganismos extremófilos	9
3.1.2 Microorganismos termófilos	10
3.1.2.1 Termófilos	10
3.1.3 Microorganismos halófilos	10
3.2 Crecimiento de microorganismos extremófilos en condiciones anaerobias	11
3.2.1 Requerimientos nutricionales	11
3.2.2 Atmósfera	12
3.3 Metabolismo fermentativo y metanogénico	13
3.3.1 Bacterias acetogénicas	13
3.3.2 Bacterias metanogénicas	14
3.4 Metabolitos de interés para la recuperación de hidrocarburo	15
3.4.1 Biogas	16
3.4.1.1 Inyección de gas en recuperaciones mejoradas	17
4. CINÉTICA	18
4.1 Crecimiento microbiano	18

4.1.1 Ecuación de Monod	19
4.1.2 Tiempo de duplicación	19
5. EFECTO DEL MEDIO POROSO SOBRE MEOR	20
5.1 Núcleos artificiales y granulados	20
5.2 Experimentos de recuperación utilizando núcleos artificiales y granulados	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1. Composición del inóculo	23
6.2. Medios de cultivo	23
6.2.1 Medio base	23
6.2.1.1 Fuente de carbono	24
6.2.2 Optimización de medios de cultivo	24
6.3 Evaluación de la formulación de medios de cultivo y de las condiciones para evidenciar la presencia de microorganismos fermentativos y/o metanogénicos y sus metabolitos	25
6.3.1 Plan general de la experimentación	26
6.3.2 Observación microscópica	27
6.3.3 Tinción de Gram	28
6.3.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	28
6.3.5 Cuantificación de gases para determinar la producción de dióxido de carbono y metano	29
6.3.6 Cuantificación de azúcares para conocer el consumo de la fuente de carbono	31
6.4 Determinación de parámetros cinéticos	31
6.4.1 Evaluación de distintas concentraciones de sustrato	32
6.5 Experimento de recuperación vía microbiana utilizando una columna empacada	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1. Evaluación de la formulación de medios de cultivo y de las condiciones para evidenciar la presencia de microorganismos fermentativos y/o metanogénicos y sus metabolitos	34
7.1.1 Observación microscópica de los cultivos anaerobios	34

7.1.2 Tinción de Gram	35
7.1.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	38
7.1.4 Producción de dióxido de carbono	40
7.1.5 Producción de metano	41
7.1.6 Determinación de azúcares	42
7.2 Determinación de parámetros cinéticos	42
7.3. Experimento de recuperación vía microbiana utilizando una columna empacada	46
7.3.1 Porosidad del medio	47
7.3.2 Recuperación secundaria con salmuera	48
7.3.3 Recuperación mejorada vía microbiana	48
7.3.3.1 Cuantificación de proteína	48
7.3.3.2 Producción de biogas	49
7.3.4 Porcentaje de recuperación de crudo por actividad microbiana	50
8. CONCLUSIONES	52
9. BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	i
Anexo 1 Soluciones estándar	i
Anexo 2 Solución de oligoelementos de Balch	ii
Anexo 3 Solución de vitaminas de Balch	iii
Anexo 4 Composición de una cápsula de vitaminas BIOMETRIX	iv

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1.	Clasificación de extremófilos con base en el factor ambiental que soportan	9
Tabla 2.	Reactivos y concentraciones del medio base para anaerobios	24
Tabla 3.	Plan general de la experimentación para promover el crecimiento simultáneo de microorganismos fermentativos y metanogénicos	26
Tabla 4.	Evaluación de turbiedad como abundancia relativa	27
Tabla 5.	Reactivos para la preparación de azul de Coomassie	29
Tabla 6.	Curva patrón de glucosa	31
Tabla 7.	Valores máximos de biomasa obtenidos durante la primera semana de experimentación a 70°C	39
Tabla 8.	Parámetros cinéticos en la producción de CO ₂	41
Tabla 9.	Determinación de azúcares	42
Tabla 10.	Parámetros cinéticos en función de la concentración de la fuente de carbono	44
Tabla 11.	Cálculo de la porosidad del medio	47
Tabla 12.	Parámetros cinéticos de la producción de CO ₂ en la columna empacada	50

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.	Fases de crecimiento microbiano: adaptación, exponencial, estacionaria y muerte	18
Figura 2.	Procedimiento para promover el crecimiento de microorganismos fermentativos y metanogénicos	27
Figura 3.	Cromatograma patrón de gases cuantificados con base en su tiempo de retención	30
Figura 4.	Columna empacada para el experimento de recuperación vía microbiana	33
Figura 5.	Abundancia relativa de microorganismos en 3 diferentes medios incubados a 70°C y 80°C en atmósferas de N ₂ /CO ₂ e H ₂ /CO ₂	34
Figura 6.	Observación microscópica de cocos y bacilos de los cultivos con tinción de Gram	36
Figura 7.	Biomasa generada en los cultivos anaerobios en los 3 medios incubados a 70°C y 80°C en atmósferas de N ₂ /CO ₂ e H ₂ /CO ₂	38
Figura 8.	Producción de CO ₂ en los cultivos anaerobios en los 3 medios incubados a 70°C y 80°C en atmósferas de N ₂ /CO ₂ y H ₂ /CO ₂	40
Figura 9.	Evaluación simultánea de biomasa, CO ₂ y azúcar residual en los cultivos anaerobios a 70°C, N ₂ /CO ₂ y medio 2 en distintas concentraciones de sustrato	43
Figura 10.	Curva de crecimiento de microorganismos anaerobios a 70°C, N ₂ /CO ₂ y medio 2 en distintas concentraciones de sustrato	46
Figura 11.	Experimento de recuperación	48
Figura 12.	Biomasa generada en el sistema anaerobio en una columna empacada con berea como medio poroso incubado a 70°C en atmósfera de N ₂ /CO ₂	49
Figura 13.	Producción de CO ₂ en el sistema anaerobio en una columna empacada con berea como medio poroso incubado a 70°C en atmósfera de N ₂ /CO ₂	50

1. INTRODUCCIÓN

La industria petrolera es una de las más importantes en México debido a los niveles de contribución para la economía nacional; luego entonces; el país requiere de grandes volúmenes de crudo, aumentando así la demanda y disminuyendo las reservas existentes. La restitución de las reservas puede lograrse de dos maneras: una es descubrir nuevos yacimientos y otra es obtener la máxima cantidad posible de crudo de los yacimientos explotados, donde generalmente queda, al menos 60% de aceite. Esta última alternativa considera recuperar una fracción del aceite que permanece en los yacimientos después de haber aplicado procesos de recuperación primaria y secundaria (Muñoz et al., 2007). La recuperación mejorada o terciaria se basa en la aplicación de tecnologías que usan procesos fisicoquímicos o biológicos con los cuales se logra mantener o aumentar la producción de aceite de los yacimientos y toman en cuenta las particularidades geológicas, de fluidos, petrográficas y otras del yacimiento en cuestión.

La recuperación mejorada de hidrocarburo vía microbiana (*Microbial Enhanced Oil Recovery* o MEOR) tiene como fundamento el uso y aprovechamiento de metabolitos como gases, solventes y otros compuestos producidos por microorganismos para incrementar la recuperación de hidrocarburo (Bryant, 1989). En el presente trabajo se estudiaron microorganismos capaces de producir principalmente CO₂ y CH₄, ya que estos gases disminuyen la viscosidad del crudo, la tensión interfacial y represurizan el pozo. Los microorganismos productores de CO₂ y CH₄ se denominan fermentativos y metanogénicos respectivamente y llevan a cabo su metabolismo en condiciones anaerobias.

Para encontrar las condiciones bajo las cuales los microorganismos fermentativos y metanogénicos presentaron un mayor crecimiento, se realizaron cinéticas de crecimiento utilizando cultivos con combinaciones en la formulación del medio, temperatura y atmósfera. Los efectos de estas condiciones sobre los cultivos se evaluaron a través de ensayos microbiológicos y fisicoquímicos, los cuales no solo sirvieron para conocer la características morfológicas de los microorganismos sino también para cuantificar los metabolitos producidos, específicamente biomasa, CO₂ y CH₄.

Una vez conocidas las condiciones más adecuadas de crecimiento de microorganismos fermentativos y/o metanogénicos, se evaluó el efecto del medio poroso sobre la recuperación de hidrocarburo en laboratorio; ya que tanto la porosidad como la permeabilidad son factores a considerar en la aplicación de MEOR (Sayyoub et al., 1992). El objetivo principal de un experimento de recuperación, a nivel laboratorio y/o planta piloto, es evaluar el porcentaje de recuperación de hidrocarburo después de haber hecho una recuperación secundaria, simulando así un sistema MEOR. En experimentos realizados tanto a nivel laboratorio como en campo, se han obtenido incrementos en la recuperación de crudo desde el 15% hasta el 30% (Wagner et al., 1993, Sayyoub et al., 1992).

En este trabajo se propone una formulación de condiciones que permiten un mejor crecimiento de microorganismos fermentativos y/o metanogénicos provenientes de aceite de un pozo petrolero. Asimismo, estudia la microbiología de dichos microorganismos a través de su caracterización cinética así como su efecto sobre la recuperación de hidrocarburo a nivel laboratorio.

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país la demanda de hidrocarburos se incrementa constantemente, las reservas disminuyen y la posibilidad de descubrir nuevos yacimientos es más lejana; por lo que es necesario desarrollar nuevas tecnologías para recuperar el máximo posible de hidrocarburos de un yacimiento y/o pozo.

La biotecnología a través del uso de microorganismos y/o sus metabolitos es una buena alternativa de recuperación en yacimientos y/o pozos que hayan sido previamente explotados (maduros o fríos), ya que aporta tanto conocimientos como antecedentes sobre una tecnología a través de la cual sea posible recuperar hidrocarburos de una manera eficaz y rentable.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer y determinar las condiciones necesarias para inducir el crecimiento simultáneo de microorganismos fermentativos y metanogénicos provenientes de muestras de aceite y evaluar su efecto sobre la recuperación de hidrocarburo en un medio poroso.

Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones y medios de cultivo para favorecer el crecimiento y producción de metabolitos de bacterias fermentativas y metanogénicas.
- Conocer los parámetros cinéticos, tiempo de duplicación, velocidad específica de crecimiento, constante de saturación (K_s) y rendimiento de cultivos fermentativos y metanogénicos.
- Evaluar el efecto de los microorganismos con mayor producción de metabolitos a través de una prueba de recuperación en medio poroso a nivel laboratorio.

2. GENERALIDADES

2.1. Yacimientos y métodos de recuperación de hidrocarburo.

Un yacimiento petrolero es una porción de trampa geológica que contiene hidrocarburos, que se comporta como un sistema hidráulicamente interconectado, y donde los hidrocarburos se encuentran a temperatura y presión elevadas ocupando los espacios porosos (Figura 1) (SENER, 2003).

Para la extracción del crudo contenido en un yacimiento se reconocen tres diferentes etapas: recuperación primaria, secundaria y/o terciaria.

- a) **La recuperación primaria** consiste en la extracción del petróleo utilizando únicamente la energía natural disponible en los yacimientos para desplazar los fluidos a través de la roca del yacimiento hacia los pozos productores (SENER, 2008).
- b) **La recuperación secundaria** consiste en el conjunto de técnicas de extracción adicional de petróleo aplicadas después de la recuperación primaria, tales como la inyección de agua o gas, con el propósito de mantener la presión del yacimiento y así facilitar el flujo del petróleo desde la roca en que se encuentra embebido hacia el pozo productor (SENER, 2008).
- c) **La recuperación terciaria o mejorada** consiste en la inyección de materiales, tales como gases, solventes, polímeros y/o microorganismos, que modifican el comportamiento dinámico de los fluidos residentes. El objetivo es mejorar la recuperación del hidrocarburo y obtener aún más crudo del que se puede recuperar por medio de recuperación primaria o secundaria (SENER, 2008).

2.2. Recuperación mejorada de hidrocarburo vía microbiana

La recuperación mejorada de hidrocarburo vía microbiana, MEOR por sus siglas en inglés (*Microbial Enhanced Oil Recovery*), es una tecnología de recuperación terciaria que se basa en la utilización de distintos productos metabólicos, tales como biosurfactantes, gases, polímeros, y solventes obtenidos de microorganismos con el propósito de facilitar la salida del aceite a través de los poros de roca (Bryant et al., 1989).

La aplicación de MEOR en campo puede llevarse a cabo a través de:

- i) Inducir selectivamente el crecimiento y la actividad metabólica de microorganismos (extremófilos o no) presentes en los pozos y/o yacimientos.
- ii) Adicionar microorganismos exógenos con actividades metabólicas de interés adaptados a las condiciones específicas de los yacimientos.
- iii) Aplicar productos microbianos: enzimas, biosurfactantes y biopolímeros, entre otros (Bryant, 1989).

De las aplicaciones mencionadas, la estimulación selectiva de microorganismos endógenos representa una buena estrategia de aplicación para MEOR ya que conociendo las condiciones óptimas para estimular a los microorganismos endógenos del yacimiento, se evitaría la necesidad de inyección de productos microbianos y/o de microorganismos exógenos los cuales podrían iniciar una competencia de sobrevivencia con los endógenos teniendo como resultado una posible inhibición de crecimiento de los microorganismos inyectados provocando una disminución en la eficiencia de recuperación (E.U. Pat. No. 4,905,761).

2.2.1. Mecanismo de aplicación en campo

La tecnología MEOR requiere un diseño específico dependiendo del tipo de yacimiento al que pretende aplicarse, ya que ningún yacimiento es igual a otro (Van Hamme et al., 2003).

Para aplicar en campo la recuperación vía microbiana, se requieren considerar los siguientes puntos:

- a) Las propiedades fisicoquímicas del reservorio: salinidad, pH, temperatura, presión y disponibilidad de nutrientes (Khire y Khan, 1994).
- b) La microbiología del yacimiento, es decir, los microorganismos endógenos que lo habitan (Bryant, 1989).
- c) Propiedades geológicas como: porosidad y profundidad del yacimiento; así como el tipo de sales o minerales que lo conforman, ya que éstas pueden afectar el crecimiento microbiano (Bryant, 1989).
- d) La heterogeneidad del yacimiento, debido a que éste no es uniforme y cada segmento de él presenta características físicas, químicas y geológicas distintas (Van Hamme et al., 2003).
- e) Viscosidad, densidad y °API del crudo que se pretende extraer, con el fin de evaluar los cambios fisicoquímicos que se presenten durante la extracción del mismo (Bryant, 1989).
- f) Factores económicos, es decir, si aplicar la tecnología será viable económicamente para el objetivo que se persigue (Jang et al., 1984).

Cada yacimiento presenta propiedades características; debido a esto no hay un procedimiento generalizado sobre la aplicación de MEOR, por lo que para tener éxito en su aplicación en campo se requiere conocer la ecología microbiana del yacimiento para poder manipular y estimular el crecimiento de los microorganismos y/o la formación de bioproductos (Van Hamme et al., 2003).

2.3. Reseña histórica sobre la recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana

La idea sobre la utilización de microorganismos y/o sus bioproductos en procesos para incrementar la recuperación de hidrocarburos fue propuesta por Beckman en 1926 (Hitzman, 1983). A partir de esto, el interés en MEOR fue incrementándose gradualmente con los experimentos que ZoBell llevó a cabo en 1946 y 1947, los cuales dieron inicio a los primeros estudios relacionados con la recuperación mejorada de aceite vía microbiana, ya

que en 1946 realizó experimentos con dos bacterias presentes en una mezcla acuosa de nutrientes; conocidas como *Desulfovibrio* sp. y *Clostridium* sp., encontrando que éstas producían gases, ácidos orgánicos y surfactantes. En 1947, descubrió la generación de biosurfactantes en *Bacillus licheniformes* y la formación de biopolímeros en *Leuconostoc mesenteroides* (ZoBell, 1947).

En los 50's algunas compañías americanas realizaron investigaciones para el avance de MEOR; sin embargo dicha información solo se encontraba disponible a través de patentes, por lo que el limitado acceso a la literatura sobre el tema representó un obstáculo económico y tecnológico para el progreso en los estudios de MEOR. La compañía neoyorquina Socony Mobil Oil Company, Inc., es un ejemplo de lo mencionado, ya que ésta patentó en 1957 una técnica alternativa para la recuperación de crudo, la cual consiste en la inyección de microorganismos capaces de sobrevivir bajo condiciones de yacimiento, los cuales deben ser anaerobios facultativos o estrictos, capaces de fermentar azúcares y tener una producción elevada de gases, llamándoles "gases de fermentación" refiriéndose al CO₂, CH₄ e H₂. En esta patente, se atribuye a los gases producidos la disminución de la viscosidad del crudo así como la disminución de la tensión interfacial entre el agua y el crudo. También se sugiere que microorganismos como *Escherichia freundii*, *Clostridium butylicum* y *Bacillus polymyxa* son adecuados para realizar el mecanismo de recuperación que proponen (E.U. Pat. No. 2,807,570).

Posteriormente, a principios de los 70, la devaluación del dólar trajo consigo una disminución del precio del petróleo, que se pagaba en dólares. Este hecho, sumado a la guerra del Yom Kippur en medio oriente en 1973, tuvo como consecuencia el aumento en el precio del petróleo árabe y el embargo de envíos petroleros a occidente por parte de la Organización de los Países Exportadores del Petróleo Árabes (OPEP) dando origen a una crisis petrolera, la cual llevó a países como Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña y Alemania a buscar una independencia energética, renovando así, el interés en las tecnologías asistidas y mejoradas de recuperación de hidrocarburo (Blinder, 1979).

Hacia el final de los años 70's, la estimulación de pozos individuales y el taponamiento selectivo habían sido demostrados como aplicaciones factibles de campo (Cobeñas y Hogg, 1998).

En 1983, Jang y colaboradores, trabajaron con cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* y *Clostridium acetobutylicum* y determinó que estos microorganismos presentan una aplicación potencial para procesos de recuperación mejorada de aceite argumentando que el transporte de dichos microorganismos a través del medio poroso del yacimiento es un criterio clave a considerar al realizar procesos de MEOR ya que el grado de penetración y movilidad que presenten las bacterias puede contribuir o afectar la recuperación del crudo.

En los 90's, Moritis (1996) publicó en el Oil & Gas Journal un informe indicando que de 1990 a 1996 más de 2000 pozos recibieron tratamientos con bacterias y hasta 1996 se tenían reportados 400 proyectos activos en Estados Unidos aplicando la tecnología MEOR.

En conclusión, la investigación ha dirigido sus esfuerzos hacia el estudio de la recuperación terciaria dado que ésta representa una buena alternativa para mejorar la recuperación del crudo, pues se ha comprobado que los procesos denominados MEOR crean una repesurización del yacimiento y disminuyen la viscosidad del crudo facilitando su salida (Van Hamme et al., 2003).

3. MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE MEOR

3.1. Microorganismos que pueden mejorar la recuperación de hidrocarburo

3.1.1. Microorganismos extremófilos

Un hábitat con características extremas, como lo es un yacimiento petrolero, puede ser colonizado por microorganismos con estrategias adaptativas particulares. Los microorganismos extremófilos son aquellos capaces de sobrevivir y crecer en ambientes considerados como hostiles para la mayoría de los organismos vivos, siendo quizá una forma de vida de las más antiguas de la Tierra (Clive, 1990). Los microorganismos extremos se han clasificado en 6 tipos diferentes con base en el factor ambiental que soportan (Madigan et al., 1999): termófilos, psicrófilos, barófilos, halófilos, acidófilos y alcalófilos (Tabla 1). Los microorganismos extremófilos de interés para esta propuesta son principalmente los termófilos, halófilos y barófilos.

Tabla 1. Clasificación de extremófilos con base en el factor ambiental que soportan.

Fuente: Madigan et al., 1999

MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS		
FACTOR	CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Temperatura	Psicrófilo	Temperatura de crecimiento entre 15 y 19.9 °C
	Termófilo e Hipertermófilo	Temperatura de crecimiento entre 45 y 115 °C
pH	Alcalófilo	pH de crecimiento mayor a 9
	Acidófilo	pH de crecimiento menor a 5
Salinidad	Halófilo	Requieren la presencia de cloruro sódico, habitan en ambientes muy salinos. (>20% NaCl)
Presión	Barófilo	Crecimiento a presiones mayor a 1 atm hasta 400 atm, habitan en fuentes hidrotermales o en pozos petroleros.

Los microorganismos que se encuentran en los yacimientos petroleros son en su mayoría anaerobios facultativos o estrictos; asimismo son termófilos, halófilos y barófilos.

Las condiciones de los yacimientos petroleros, como la temperatura, varían en un amplio intervalo: el gradiente de presión va de las 1.40×10^{-3} psia/m a las 3.28×10^{-3} psia/m dependiendo del área geográfica, el pH puede ser desde 3 hasta 10 y la concentración de sales en ellos es mayor que 10 % medido como NaCl (Clark et al., 1989).

3.1.2. *Microorganismos termófilos*

3.1.2.1. Termófilos

Los microorganismos termófilos crecen por encima de los 45°C hasta los 80 °C, generalmente son procariontes e incluyen a las cianobacterias, bacterias fotosintéticas, bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, bacterias ácido lácticas, *Mycoplasma*, *Pseudomonas* y *Actinomyces*. Metabólicamente, la mayoría de los termófilos conocidos son quimioorganoheterótrofos, utilizan diferentes fuentes de carbono: azúcares, peptonas, algunas cepas son degradadoras de polímeros como la celulosa y de hidrocarburos (Lacey, 1990; Hebert et Cood, 1986). Algunos de ellos se encuentran en zonas volcánicas, sistemas hidrotérmicos submarinos y yacimientos de petróleo (Jeanthon et al., 2005).

La temperatura de incubación es un factor crítico que afecta el crecimiento de microorganismos. La temperatura del pozo petrolero de donde se tomó la muestra utilizada en el presente trabajo fluctúa entre 60°C y 80°C, por lo tanto los microorganismos nativos de dicho ambiente crecen en el intervalo de termofilia (Madigan et al., 1999).

3.1.3. *Microorganismos halófilos*

Los microorganismos halófilos presentan crecimiento óptimo en medios con altas concentraciones de sales, medidas como NaCl, que van desde un 3% hasta la saturación. El tipo de organismos en estos ambientes está determinado por parámetros como salinidad, composición iónica y presión osmótica. (Rodríguez-Valera, 1988). Los microorganismos halófilos presentan un gran potencial para ser aplicados en procesos industriales ya que

presentan grandes ventajas: fáciles de crecer y de mantener en el laboratorio, producen osmorreguladores y acumulan altas concentraciones de iones (Ventosa et Nieto, 1998).

Diversos microorganismos halófilos han sido aislados, los cuales pertenecen a diferentes géneros; dentro de los halófilos moderados se encuentran bacterias organotróficas de los géneros *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Acinetobacter*, *Deleya*, *Marinomonas*, *Flavobacterium*, *Halomonas* y *Halovibrio*. Los halófilos extremos como los géneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Natronobacterium* y *Natronococcus*, *Natroniella*, *Acetohalobium*, *Halanaerobacter* y *Orenia* todos ellos quimiorganótrofos (Ollivier et al., 1998).

Los yacimientos en general tienen una concentración salina mínima de 20 g/L medida como NaCl, por lo que los microorganismos crecen, lo hacen bajo condiciones de halofilia (Przybulewska et Krompiewska, 2005). Asimismo, en ambientes hipersalinos la solubilidad de oxígeno es baja ya que la presencia de sales minerales reduce los espacios intermoleculares disponibles para la disolución del oxígeno dificultando así su disponibilidad para microorganismos aerobios y al mismo tiempo promoviendo el crecimiento de microorganismos anaerobios halófilos (Horikoshi, 1996).

3.2. Crecimiento de microorganismos extremófilos en condiciones anaerobias

3.2.1. Requerimientos nutricionales

Un medio de cultivo debe contener los elementos y concentraciones necesarios para propiciar el crecimiento de un grupo de microorganismos en particular o de una cepa en específico, además de suministrar energía para la síntesis de metabolitos y mantenimiento celular. Los requerimientos nutricionales varían considerablemente dependiendo del grupo de microorganismos que se trate, los requerimientos son (Quintero-Ramírez, 1987):

- i) *Macronutrientes*, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por: C, N, P, S, K y Mg.
- ii) *Micronutrientes o elementos traza* representados por las sales de Mn, Fe, Ca, Zn Mo, Ni y Co.

- iii) *Factores de crecimiento*, que están constituidos por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, entre otros.
- iv) *Fuente de energía o sustrato*, que puede ser orgánica o inorgánica.

La formulación del medio de cultivo, su preparación, sus condiciones de incubación y las características de la muestra sirven para inducir el crecimiento de un grupo específico de microorganismos e inhibir el de otros. Las bacterias fermentativas obtienen energía de sustratos orgánicos tales como glucosa y las metanógenas de orgánicos como el acetato u inorgánicos como $H_2 + CO_2$ (Whitman et al., 1992). Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica.

Con el objeto de obtener la energía necesaria para su metabolismo, los microorganismos llevan a cabo procesos de biooxidación, lo cual significa que hay transferencia de electrones (Madigan et al., 1999). En los procesos de fermentación, las reacciones bioquímicas de oxido-reducción transfieren electrones a partir de sustratos orgánicos (Gottschalk, 1986).

3.2.2. *Atmósfera*

La atmósfera más apropiada para los sistemas anaerobios depende del tipo de metabolismo que se pretenda favorecer. Para los microorganismos estrictamente anaerobios la ausencia de oxígeno de los medios de cultivo es esencial, los microorganismos anaerobios pueden desarrollarse en atmósferas con 5-10% de H_2 , 5-10% CO_2 y 80-90% de N_2 libres o mezclas de ellos (Sumnanen, 1993).

Algunos autores reportan la importancia del CO_2 y el H_2 como sustratos para la producción de metano (Paulo et al., 2003; Whitman et al., 1992). Sin embargo, en otros trabajos utilizan una atmósfera de N_2/CO_2 con buenos resultados (Takai et Horikoshi, 2000; Yamaguchi et Minami, 1998). Las bacterias metanógenas, acetogénicas y las fermentadoras se favorecen con la atmósfera de N_2/CO_2 , en tanto que las metanógenas, hidrogenotróficas y metilotróficas crecen en atmósfera de H_2/CO_2 (Levett, 1991).

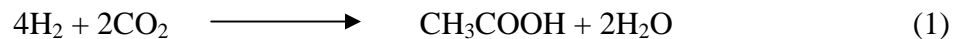
3.3. Metabolismo fermentativo y metanogénico

Los microorganismos requieren principalmente de una fuente de carbono, energía y nutrientes para llevar a cabo su metabolismo y sobrevivir en su hábitat. A través de la degradación de diversos compuestos o sustratos, los microorganismos dan origen a bioproductos que pueden ser fuente de carbono y/o energía para otro grupo microbiano. Los microorganismos existentes en los pozos petroleros siguen diversas rutas metabólicas como la fermentación y la metanogénesis a través de las cuales se obtienen bioproductos que incrementan la recuperación del crudo y por lo tanto hacen viable la aplicación de una tecnología MEOR.

3.3.1. Bacterias Acetogénicas

Estas bacterias forman ácido acético ó acetato como producto final de la fermentación, el cual utilizarán posteriormente las bacterias metanogénicas como fuente de carbono para producir CO₂ como producto intermedio de su metabolismo. Existen distintas rutas que los microorganismos pueden seguir para la fermentación del acetato, las cuales se describen a continuación (Gottschalk, 1986):

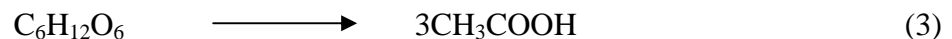
Al utilizar CO₂ como fuente de carbono e H₂, de acuerdo con la siguiente ecuación:



También por cada 4 moléculas de CH₃OH y 2 de CO₂, se originan 3 de CH₃COOH.



Una C₆H₁₂O₆ puede ser degradada hasta obtener 3 moléculas de ácido acético.



Los microorganismos que llevan a cabo alguna de las rutas metabólicas para la fermentación del acetato son: *Clostridium aceticum*, *C. thermoautotrophicum*, *C. formicoaceticum*, *C. thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, *A. wieringae*, *Acetogenium kivui* y *Sporomusa sphareoides* (Gottschalk, 1986).

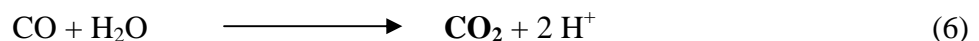
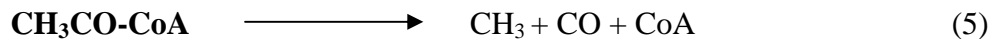
3.3.2. Bacterias Metanogénicas

La metanogénesis es una ruta metabólica en la que a partir de un sustrato y de una serie de reacciones subsecuentes se sintetiza CH₄ y es llevada a cabo por bacterias llamadas metanogénicas. Este grupo microbiano es estrictamente anaerobio y habita tanto en yacimientos petroleros como en sedimentos marinos (Gottschalk, 1986).

En la metanogénesis ó síntesis del metano, el CO₂ funge como aceptor de electrones y compuestos como formato, metanol y acetato actúan como donadores de electrones. Este proceso puede ser llevado a cabo a partir de diferentes sustratos y siguiendo distintas rutas; sin embargo lo que interesa es conocerla a partir del acetato como fuente de carbono ya que como se mencionó en el punto 3.3.1. las bacterias fermentativas producen acetato al final de la fermentación y éste, a su vez, puede ser aprovechado por las metanogénicas para producir metano y/o dióxido de carbono, los cuales favorecen la recuperación de hidrocarburo. A continuación se muestra la ruta general a partir de acetato (Gottschalk, 1986):



Para tener un mayor entendimiento de ésta ruta aquí se presentan las reacciones a través de las cuales se obtienen los productos finales (Gottschalk, 1986):



La metanogénesis con acetato como fuente de carbono, comienza con éste unido a la coenzima A, formando la acetil-coenzima A, teniendo como primeros productos intermedios un metilo, monóxido de carbono, y separándose la coenzima A (5). En la segunda etapa el agua oxida al CO (5) convirtiéndolo en CO₂ y liberando 2 protones H⁺ (6). En la última etapa el CH₃ obtenido en (5) utiliza 1 protón de los obtenidos en (6) y se forma el metano, mientras que el otro protón se utiliza para que se libere la molécula de ATP que se observa en (7). De ésta manera se puede observar que por cada molécula de acetato se obtiene una de metano.

Algunos microorganismos que llevan a cabo esta ruta metabólica son: *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanotherix soehngenii* y *Methanopñanus limícola* (Gottschalk, 1986).

3.4. Metabolitos de interés para la recuperación de hidrocarburo

Los microorganismos producen compuestos los cuales, en conjunto, mejoran la recuperación del aceite entrampado en las rocas del reservorio después de una recuperación primaria y secundaria (Bryant et al., 1987). Entre éstos compuestos se encuentran biopolímeros, biosurfactantes, biosolventes, biomasa y biogases.

Biopolímeros: Sirven para provocar taponamientos zonalmente selectivos con el propósito de inducir el flujo hacia los pozos productores (Muñoz et al., 2007).

Biosurfactantes: Estos agentes tensoactivos reducen la tensión interfacial agua/aceite, también forman emulsiones que provocan la adhesión al aceite y finalmente actúan sobre las fuerzas capilares disminuyéndolas. Estos mecanismos favorecen y facilitan la movilidad del aceite (Muñoz et al., 2007).

Los compuestos biosurfactantes son eficientes en un amplio intervalo de condiciones de aceite y yacimientos (Pines et al., 1983). Rapp y colaboradores reportaron en 1977 un incremento hasta de 30% sobre la recuperación de hidrocarburos por efecto del biosurfactante producido por la bacteria *Nocardia rhodochrous*.

Biosolventes: Los microorganismos producen alcoholes, cetonas y ácidos orgánicos, que tienen los siguientes efectos: disolución de carbonatos de la roca madre, incremento de la permeabilidad o capacidad de absorción del yacimiento, reducción de la tensión interfacial y disminución de la viscosidad, mejorando, así la movilidad del aceite (Muñoz et al., 2007).

Producción de biomasa: Los microorganismos se autopropagan y autodesplazan de tal modo que pueden actuar como un tapón selectivo de ciertas zonas del yacimiento para inducir el flujo hacia el pozo productor, (Muñoz et al., 2007).

El crecimiento microbiano ocurre con mayor frecuencia en las zonas del yacimiento con mayor permeabilidad, teniendo un efecto positivo en la recuperación de hidrocarburo (Raiders et al., 1989)

3.4.1. Biogas

La actividad metabólica de los microorganismos en condiciones de yacimiento y función de los aceptores finales de electrones disponibles, produce gases como metano, nitrógeno y bióxido de carbono, los cuales producen efectos que ayudan a una mejora en la recuperación de hidrocarburo (Muñoz et al., 2007).

La producción de biogas (principalmente de CO₂) en el yacimiento incrementa la presión del sistema, disminuye la viscosidad del crudo y mejora el flujo de éste a través de las rocas del reservorio debido a su miscibilidad con el crudo en el reservorio (Almeida et al., 2004), por lo que para algunos autores, es el metabolito que más favorece a la recuperación de hidrocarburo; sin embargo la producción de cualquier metabolito en beneficio de MEOR, depende no solo del microorganismo que lo produzca, sino también de las características del yacimiento tales como porosidad, permeabilidad, entre otras.

Kuznetsov y colaboradores (1963), encontraron bacterias provenientes de un yacimiento soviético las cuales producían 2 g de CO₂ por día por tonelada de roca, favoreciendo la salida de crudo del reservorio.

Reynolds y colaboradores (1989), utilizaron diferentes cepas de *E.coli* para experimentos de recuperación, evaluando la producción de gas que presentaban, y observaron que las cepas que mostraron la mayor producción de gases presentaron un índice de penetración al medio poroso cinco veces mayor que aquellas cepas que no produjeron ningún gas.

3.4.1.1. Inyección de gas en recuperaciones mejoradas de hidrocarburo

La utilización de gas o biogas en recuperación mejorada de crudo ha tenido éxito y en los trabajos que se exponen a continuación se obtuvo un incremento en la producción de crudo; asimismo sus respectivos autores atribuyeron esta mejora a la utilización del CO₂.

En 2004, se realizaron recuperaciones secundarias en yacimientos de Dakota del Norte y de acuerdo a los resultados obtenidos, se calculó que se requirió una inyección de 7 a 8 mil pies cúbicos de CO₂ por cada barril de crudo recuperado y reportaron un factor de recuperación del 8 al 11 % (Nelms y Burk, 2004).

Aízprua y Rodríguez. (2006), realizaron un simulador para evaluar el efecto de la inyección de CO₂ en yacimientos de España y concluyeron que, de llevar a cabo dicho procedimiento, resultaría en un incremento de presión en el yacimiento en casi 350 KPa, lo cual junto con la miscibilidad del CO₂ y el petróleo, contribuiría al aumento de la producción de petróleo.

En 2008, PEMEX presentó un informe sobre la experiencia que han tenido en la utilización de CO₂ para recuperación mejorada de hidrocarburo y reportan que para dos yacimientos probados utilizaron un promedio de 25 mil millones de pies cúbicos diarios (mmpcd) de CO₂ teniendo un incremento en el factor de recuperación de 0.4 %; asimismo reportan una producción anual de 889 barriles de petróleo diarios (bpd) atribuible a la inyección de gas (Sánchez et al., 2008).

4. CINÉTICA

En microbiología, la cinética comprende el estudio de la respuesta de crecimiento o de inhibición de los microorganismos en función de factores que le afectan como son: temperatura, pH, concentración de nutrientes, entre otros. De los parámetros más importantes a determinar en una cinética están: el tiempo de duplicación, la velocidad específica de crecimiento y la constante de saturación ya que a través de ellos, se puede conocer el tiempo que tardan en reproducirse, la cantidad de metabolitos producidos así como la afinidad que tienen por el sustrato del medio en el que se encuentran (Muñoz et al., 2007).

4.1. Crecimiento microbiano

El cultivo microbiano pasa típicamente por cuatro fases de crecimiento, distintas y secuenciales (Figura 1): la fase de latencia ó adaptación, la fase log (también llamada logarítmica ó exponencial), la fase estacionaria y la fase de muerte. La fase log tiene lugar casi siempre cuando las células están en un ambiente favorable, pero no puede continuar indefinidamente. Aunque no se produce un aumento neto de la masa del cultivo durante la fase estacionaria, la composición celular cambia cuando el cultivo pasa a esta fase. Las células se hacen más pequeñas y comienzan a sintetizar componentes que les ayudan a sobrevivir, sin crecer, durante largos períodos de tiempo (Ronald, 1996).

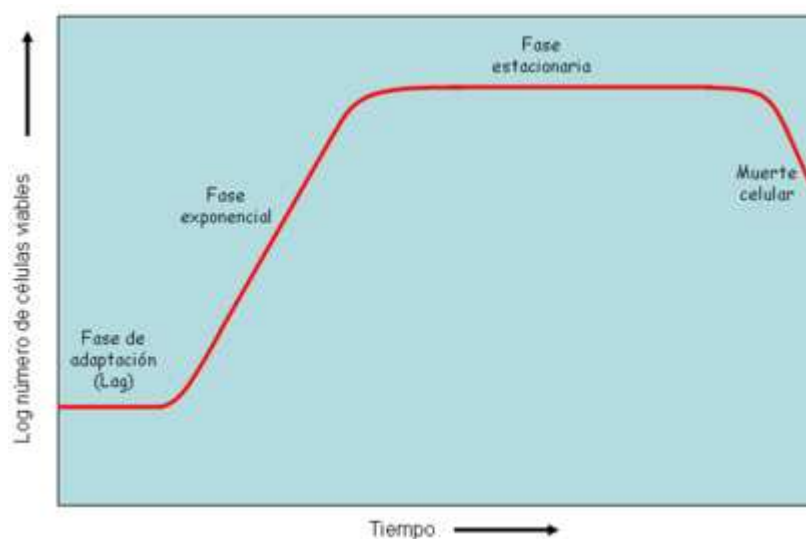


Figura 1. Fases de crecimiento microbiano: adaptación, exponencial, estacionaria y muerte.

4.1.1. Ecuación de Monod

Cuando el crecimiento del cultivo microbiano está limitado por la cantidad inicial de sustrato, la curva de crecimiento puede expresarse en términos de los parámetros de crecimiento. La ecuación de Monod (8) describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento microbiano (μ) y la concentración de un sustrato, como por ejemplo glucosa (Quintero-Ramírez, 1987):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (8)$$

Donde:

μ_{\max} = velocidad específica máxima de crecimiento

S = Concentración del sustrato

K_s = Concentración de sustrato cuando $\mu = 0.5 \mu_{\max}$.

La constante K_s indica la afinidad del microorganismo por cierto sustrato, cuanto más pequeño sea el valor de K_s mayor será la afinidad de la bacteria por el sustrato. El valor de μ aumenta en función de la concentración del sustrato hasta cierta concentración en la cual se estabiliza (Quintero-Ramírez, 1987).

4.1.2. Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación, es el período que requieren las células de una población microbiana para crecer, dividirse y dar lugar a dos nuevas células por cada una de las que existían anteriormente. El tiempo de duplicación es, aproximadamente, el mismo para todas las células de una determinada población. No cambia hasta que se agotan los nutrientes o comienzan a acumularse los productos metabólicos tóxicos. El tiempo de duplicación varía dependiendo de la especie microbiana y de las condiciones de crecimiento de la población (Madigan et al., 1999).

5. EFECTO DEL MEDIO POROSO SOBRE MEOR

Antes de aplicar en campo una tecnología como MEOR, es necesario realizar experimentos a pequeña escala ya sea a nivel laboratorio y/o planta piloto, esto con el objeto de visualizar tanto las ventajas como las desventajas que se obtendrían si se aplicara a mayor escala (Sayyoush, 2002).

Para realizar dichos experimentos se requiere tomar en cuenta las características geológicas de los yacimientos petroleros; por lo que, para cubrir este aspecto, es necesario un medio poroso, el cual puede ser un núcleo artificial o un granulado que simule a la roca (s) que constituye (n) el reservorio (Sayyoush, 2002).

5.1. Núcleos artificiales y granulados

Un núcleo es una muestra cilíndrica de roca tomada de un yacimiento durante su perforación con el fin de determinar su porosidad, permeabilidad y otras propiedades asociadas a la productividad de recuperación de crudo (Glosario Pemex.com).

A nivel laboratorio y/o planta piloto se utilizan núcleos artificiales los cuales son núcleos compuestos por arenas artificiales con características semejantes a una roca de yacimiento. También pueden utilizarse granulados cuya única diferencia con los núcleos artificiales es la geometría ya que la presentación de un núcleo es cilíndrica y la de un granulado es, como su nombre lo indica, en gránulos y/o polvo (<http://www.cbh.org.bo>).

Algunas arenas que conforman los granulados y núcleos son berea y calcita. La berea está compuesta de óxidos de silicio, aluminio, fierro, magnesio y calcio; por otro lado la calcita es únicamente carbonato de calcio (Wagner et al., 1993). Estos minerales han sido utilizados en experimentos de recuperación debido a que sus propiedades físicas (permeabilidad, porosidad, densidad, tamaño de poro) son adecuadas y semejantes a las de algunos yacimientos ya que para simular un proceso de recuperación en laboratorio o planta piloto debe considerarse la geología del reservorio en estudio para elegir la(s) arena(s) indicadas (<http://www.bereasantstonecores.com>).

5.2. Experimentos de recuperación utilizando núcleos artificiales y granulados

Experimentos de recuperación mejorada vía microbiana a nivel laboratorio han reportado la utilización de núcleos, cuya composición se asemeja a la de las rocas existentes en los yacimientos petroleros, obteniendo buenos resultados en la recuperación de aceite.

Torbati y colaboradores (1986) determinaron el tamaño de los poros de un núcleo tipo berea empleándolo en un experimento de recuperación vía microbiana. Al inicio, los poros del núcleo median entre 59 y 69 μm ; posteriormente inyectaron microorganismos y medio con el objeto de inducir actividad microbiana. Al término del experimento, midieron nuevamente el tamaño de los poros del núcleo encontrando que estos median de 20 a 38 μm , concluyendo que las zonas con mayor permeabilidad fueron obstruidas por los microorganismos y/o sus metabolitos formando tapones selectivos a través del núcleo facilitando la salida del crudo. Los autores atribuyen a este efecto el incremento del 10% que obtuvieron en la recuperación de aceite.

Wagner y colaboradores (1993) realizaron un experimento de recuperación en laboratorio con el objeto de aplicar un proceso de MEOR en un yacimiento del campo Romashkino en Rusia. El estudio se llevó a cabo a una temperatura de 20°C y con una concentración de NaCl de 30 g/L ya que estas eran las condiciones del yacimiento principalmente consideradas por los autores. Como medio poroso utilizaron un núcleo compuesto de calcita en un 90-98% saturado con crudo proveniente del yacimiento. En la primera parte inyectaron agua en el núcleo con el objeto de simular una recuperación secundaria teniendo como resultado una recuperación del 20% del crudo inicial. Posteriormente iniciaron la recuperación vía microbiana e inyectaron al núcleo una solución nutritiva de melaza con cepas de *Clostridium thyrobutyricum* las cuales presentaron actividad microbiana generando metabolitos como metanol, etanol y butanol; asimismo los autores reportaron un aumento de presión de 50 kPa a 8 MPa en el sistema, así como una disminución en la viscosidad del crudo a la salida. Por último y después de 70 días de tratamiento microbiano se obtuvo un incremento en la recuperación de crudo de 29 a 33% respecto al aceite contenido en el núcleo inicialmente.

Yakimov y colaboradores (1997) trabajaron con la cepa BPN29 de *Bacillus licheniformis* proveniente de crudos de la región norte de Alemania y realizaron experimentos de recuperación utilizando núcleos artificiales de areniscas a una temperatura de 50°C, una concentración al 12% de NaCl y una presión de 9.5 MPa. Durante el estudio inyectaron un cultivo de la cepa BPN29 en crecimiento exponencial (5×10^8 células/mL) con medio mínimo compuesto de sales minerales y sacarosa como fuente de carbono a un flujo de 2.5 mL/min. El resultado de estos tratamientos fue la producción de biopolímeros, biosurfactantes, alcoholes y ácidos atribuyendo a estos el aumento obtenido en la recuperación de aceite desde 9 hasta 22%.

Entre los experimentos más recientes, se encuentra uno realizado por Lal y colaboradores (2007), en el cual utilizaron núcleos de berea con un 19 % de porosidad; en cuanto a las condiciones, dicho experimento se llevó a cabo a 90°C durante 21 días, con un flujo de inyección de 20 mL/hora, asimismo la recuperación mejorada se realizó a través de un consorcio de microorganismos termo-barofílicos. En dicho trabajo, los autores reportaron una mejora en la recuperación del 9 % y una recuperación del 21 % del aceite residual.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó aceite proveniente del campo petrolero de Chicontepec en Veracruz. La elección del pozo mencionado se determinó con base en un estudio previo donde 19 muestras de aceite, del mismo campo, fueron cultivadas, incubadas y monitoreadas para conocer el crecimiento de microorganismos y su capacidad de producción de metabolitos (gases y biosurfactantes). Los mejores resultados se obtuvieron con los cultivos de las muestras de aceite del pozo mencionado con 19.55° API (Muñoz et al., 2007).

6.1. Composición del Inóculo

El inóculo utilizado en este trabajo provino de una mezcla de cultivos desarrollados previamente con muestras de aceite del pozo mencionado. El inóculo se compone de:

- a) Un cultivo metanogénico incubado a 70°C con atmósfera de H₂/CO₂.
- b) Un cultivo fermentativo incubado a 80°C con atmósfera de N₂/CO₂.
- c) Un preinóculo el cual se preparó adicionando 5 mL de aceite del pozo de interés en 100 mL de medio mineral basal y se incubó durante 7 días a 60° C y 115 rpm, esto se hizo con el fin de favorecer la migración de microorganismos de la fase aceitosa a la fase acuosa. La fase líquida es la que se utilizó para inocular.

La proporción de la mezcla de los cultivos y preinóculo mencionados fue 1:2:2 hasta alcanzar un volumen final 1.5 mL.

6.2. Medios de Cultivo

6.2.1. Medio Base

Las bacterias anaerobias requieren de un conjunto de nutrientes en común, los cuales son adicionados al medio con diferentes reactivos en concentraciones específicas. Este medio se denomina *medio base* y sirve para el crecimiento de cualquier microorganismo anaerobio, la composición de este medio se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos y concentraciones del *medio base* para anaerobios (Muñoz et al., 2007)

Compuesto	Fórmula	Concentración (g/L)
Cloruro de sodio	NaCl	25
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	0.250
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	0
Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄	0.140
Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.0
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.140
Cloruro de potasio	KCl	0.335
Cloruro de níquel hexahidratado	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Selenita de sodio pentahidratado	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0.0003
Extracto de levadura		2.0
Triptona peptona		2.0
Oligoelementos de Balch	(anexo 2)	10 (mL/L)
Cisteína-HCl		0.5
Resarzurina 0.1%		1 (mL/L)

6.2.1.1. Fuente de carbono

La fuente de carbono utilizada fue melaza ya que, además de ser económica, cerca del 50% de su composición son azúcares altamente disponibles para el crecimiento microbiano (Boopathy, 2002).

Se realizó una solución de melaza con una concentración de 100 g/L, por lo que para su preparación se agregaron 10 g de melaza a un frasco serológico de 125 mL y 100 mL de agua anóxica adicionada bajo flujo de N₂. El frasco fue tapado, sellado y agitado manualmente hasta la completa disolución de la melaza. Posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C y 15 lb/pulg², para finalmente hacer cambio de atmósfera con N₂/CO₂ (Muñoz et al., 2007).

6.2.2. Optimización de medios de cultivo

Para favorecer el crecimiento simultáneo de bacterias fermentadoras y metanógenas, se propusieron tres medios con algunas modificaciones, las cuales sirven para evaluar y economizar la formulación del medio de cultivo potencialmente utilizable en campo. A continuación se describen las opciones propuestas:

- i) **Medio 1 (M1)**. Medio constituido de medio basal según la Tabla 2, solución de oligoelementos (Anexo 2) y vitaminas de Balch (Anexo 3). El níquel y selenita (Tabla 2) fueron adicionados para completar los elementos necesarios para inducir el crecimiento del grupo metanogénico (Ronald, 1995). Como fuente de carbono se utilizó melaza 10 g/L.

- ii) **Medio 2 (M2)**. Medio constituido de medio basal modificado según la Tabla 2, excepto la adición de vitaminas de Balch, níquel y selenita. Se adicionaron 10 g/L de melaza. La melaza además de azúcares contiene minerales y vitaminas (Quintero-Ramírez, 1987, Curtin, 1983) por lo tanto puede fungir como fuente de carbono y sustituir a la solución de vitaminas de Balch.

- iii) **Medio 3 (M3)** Medio constituido de medio basal modificado según la Tabla 2, con 10 g/L de melaza, solución de oligoelementos de Balch (Anexo 2) y vitaminas comerciales en lugar de vitaminas grado reactivo de alta pureza. Las vitaminas se adicionaron en forma de una cápsula de BIOMETRIX por litro de medio (Anexo 4).

6.3. Evaluación de la formulación de los medios de cultivo y de las condiciones de crecimiento para evidenciar la presencia de microorganismos fermentativos y/o metanogénicos y sus metabolitos.

Para la evaluación de la formulación de los medios de cultivo y selección de las condiciones de crecimiento bajo las cuales los microorganismos presentaron mayor crecimiento así como mayor producción de metabolitos, se realizaron análisis cualitativos como la observación microscópica de preparaciones en fresco y de tinciones de Gram. Asimismo se llevaron a cabo los métodos espectrofotométricos de Bradford para cuantificar proteína (Bradford,1976) y el del fenol-sulfúrico (Dubois, 1956) para determinar el consumo de azúcares reductores; también se cuantificó la producción de dióxido de carbono y metano a través de un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica.

6.3.1. Plan general de la experimentación

Para promover el crecimiento microbiano de bacterias fermentativas y metanogénicas se llevaron a cabo 12 tratamientos diferentes con 3 réplicas cada uno, modificando las condiciones de temperatura, atmósfera y composición del medio (Tabla 3). El monitoreo de dichos tratamientos consistió en tomar 1.5 mL de muestra cada 0, 6, 12, 19, 26, 33 y 40 días en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar, mechero, jeringa y guantes). Los cultivos se agitaron manualmente durante 15 segundos una vez al día.

Tabla 3. Plan general de la experimentación para promover el crecimiento simultáneo de microorganismos fermentativos y metanogénicos.

*Tratamiento	Medio	Temperatura de incubación (°C)	Atmósfera (80/20)	Volumen de muestra para monitoreo (mL)
1	1	70	N ₂ /CO ₂	1.5
2	1	70	H ₂ /CO ₂	1.5
3	1	80	N ₂ /CO ₂	1.5
4	1	80	H ₂ /CO ₂	1.5
5	2	70	N ₂ /CO ₂	1.5
6	2	70	H ₂ /CO ₂	1.5
7	2	80	N ₂ /CO ₂	1.5
8	2	80	H ₂ /CO ₂	1.5
9	3	70	N ₂ /CO ₂	1.5
10	3	70	H ₂ /CO ₂	1.5
11	3	80	N ₂ /CO ₂	1.5
12	3	80	H ₂ /CO ₂	1.5

*Cada tratamiento se realizó por triplicado

En cada tratamiento se utilizaron botellas serológicas de 125 mL adicionadas de 40 mL de medio de cultivo (M1, M2, M3), 1 mL del inóculo compuesto por microorganismos metanogénicos y fermentativos, más 1 mL del aceite; esto en condiciones de esterilidad: dentro de una campana de flujo laminar, con un mechero Bunsen para crear área estéril así como el uso de guantes para evitar posible contaminación. Posteriormente se intercambió la atmósfera de las botellas (durante 13 min) con una mezcla de N₂/CO₂ (80/20) ó H₂/CO₂ (80/20) y finalmente se incubaron a 70°C y 80°C, respectivamente, tal como se indica en la Figura 2 (Muñoz et al., 2007).

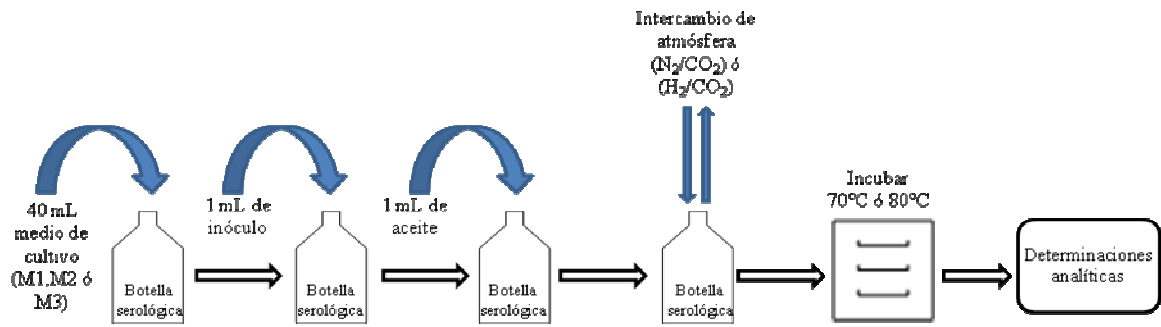


Figura 2. Procedimiento para promover el crecimiento de microorganismos fermentativos y metanogénicos.

6.3.2. Observación microscópica

Los cultivos fueron analizados cualitativamente y para confirmar si la turbiedad era debida a la presencia de microorganismos se realizó a cada cultivo un análisis microscópico de preparaciones en fresco observadas con microscopía de contraste de fases. Se tomaron 20 μ l de los cultivos en condiciones estériles con una jeringa estéril purgada con N₂ para evitar introducir O₂ dentro de la botella al momento de tomar la muestra. La observación de la muestra se realizó en el microscopio de contraste de fases con aceite de inmersión y el objetivo de 100X (Lorch et al., 1995). La evaluación presuntiva de la presencia de microorganismos se realizó bajo el criterio de abundancia relativa, el cual se describe a continuación.

Tabla 4. Evaluación de turbiedad como abundancia relativa

Turbiedad observada	Abundancia relativa
Muy poco	+
Poco	++
Regular	+++
Abundante	++++
Muy Abundante	+++++

6.3.3. *Tinción de Gram*

A las muestras con presencia regular y abundante de microorganismos, se les realizó una tinción de Gram para determinar su Gram y la morfología presente. La toma de muestra se realizó de la misma manera que en el procedimiento anterior y se preparó un frotis bacteriano, se fijó al calor y se procedió a la tinción colocando sobre el frotis los siguientes colorantes, en orden y con el tiempo indicado: cristal violeta (1 min), lugol (1 min), alcohol-acetona (30 seg) y safranina (1 min). Finalmente, se dejan secar las muestras a temperatura ambiente y se observan en el microscopio óptico (Lorch et al., 1995).

6.3.4. *Cuantificación de proteínas por el método Bradford*

El efecto de las condiciones de cultivo sobre la población microbiana pueden ser evaluadas con base en la medida de la cantidad de células que permanecen o se producen en el sistema a través del tiempo de experimentación y una opción para llevar a cabo tal cuantificación es el análisis de proteína en el sistema ya que a través de éste, en el presente trabajo, se pudo evidenciar la presencia de biomasa producida por microorganismos fermentativos y/o metanogénicos. De esta manera se cuenta con un parámetro para evaluar las mejores condiciones de cultivo sobre la población microbiana (Quintero-Ramírez, 1987).

La determinación de biomasa se llevó cabo mediante la cuantificación espectrofotométrica de proteína basada en el método de Bradford, utilizando la técnica de azul de Coomassie (Bradford, 1976). Para realizar esta determinación, primero se prepararon las muestras realizándoles 3 lavados con solución salina al 0.85% a cada una con el objeto de precipitar los compuestos proteicos contenidos en las muestras. Entre cada lavado se centrifugaron a 10,000 rpm, después se procedió a hidrolizarlas colocando en tubos de ensayo 300 µl de muestra con 1.2 mL de solución salina 0.85% y 1.5 mL de una solución NaOH 0.1 N. Las muestras se agitaron y sometieron a baño María durante 1 hora a una temperatura promedio de 85°C. Al terminar, se tomaron 0.5 mL de cada muestra hidrolizada, se adicionaron 0.5 mL del reactivo azul de Coomassie (Tabla 4), se agitaron en vortex, y la lectura se realizó en un periodo no mayor a 30 minutos utilizando un espectrofotómetro de UV-visible a 620 nm.

Tabla 5. Reactivos para la preparación de azul de Coomassie

Reactivo	Cantidad
Azul brillante G250 (0.66%)	100 mg
Etanol 95%	50 mL
Ácido fosfórico 85% p/v	100 mL

Diluir y aforar a 1 L

El cálculo de proteína se realizó utilizando una curva patrón de Albúmina de Suero Bovino (BSA). La curva patrón de BSA se realiza con concentraciones de 5 a 30 mg/L. A diferencia de las muestras, la BSA no es sometida al proceso de hidrólisis (Bradford, 1976).

6.3.5. Cuantificación de gases para determinar la producción de dióxido de carbono y metano

Los microorganismos utilizados en este trabajo cuentan con un metabolismo fermentativo y/o metanogénico de tal manera que producen CO₂ y CH₄ los cuales son cuantificables a través de una cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica equipado con una columna (CTR 1), helio grado ultra-altapureza (UAP), metano al 99%. Para la toma de muestra, con ayuda de una jeringa y aguja hipodérmicas, se extrajo un volumen de gas de 0.5 mL del espacio de cabeza de la botella y se inyectó directamente al cromatógrafo. La inyección de la muestra es en forma manual y las condiciones del equipo fueron las siguientes (Muñoz et al., 2007):

- Temperatura de la columna 25 °C
- Temperatura del detector 45 °C
- Temperatura del inyector 100 °C
- Gas acarreador: helio a un flujo de 60 mL min⁻¹
- Corriente: 125 mV
- Volumen de muestra inyectada: 0.5 mL

Previamente a la inyección de muestra, se realizó una curva patrón de los gases a cuantificar de acuerdo con su tiempo de retención. Bajo las condiciones del cromatógrafo utilizado estos tiempos son: 1 min para el CO₂, 1.5 min para el O₂, 1.9 min para el N₂ y 3.5 minutos para el CH₄ (Figura 3).

Cabe mencionar que se cuantificaron gases como el oxígeno ya que éste es un parámetro que permitió evidenciar una posible contaminación del sistema ya que el cultivo debía desarrollarse en condiciones anaerobias. También se cuantifica el nitrógeno debido a que está inmerso en las muestras a las que se les realizó un cambio de atmósfera.

Utilizando el software CHROMPERFECT 2.0 se obtuvo el área de cada pico (en %) de las muestras inyectadas. Por último se calcularon los moles de CH_4 y CO_2 aplicando la ecuación de los gases:

$$PV = nRT \quad (8)$$

Despejando
$$n = PV / RT \quad (9)$$

Nota: Para el cálculo de moles de CO_2 se restó la concentración del gas con la que se realizó el intercambio de atmósfera en cada tratamiento.

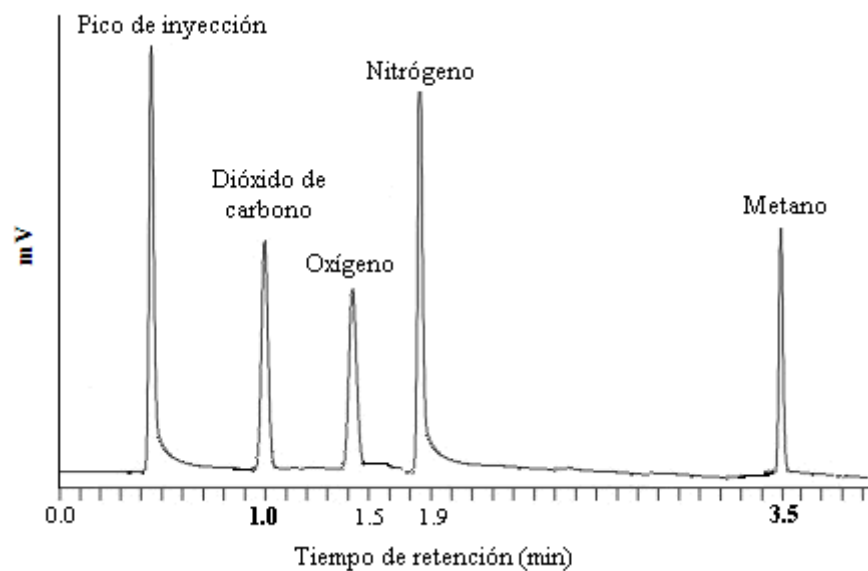


Figura 3. Cromatograma patrón de gases cuantificados con base en su tiempo de retención

6.3.6. Cuantificación de azúcares para conocer el consumo de la fuente de carbono

Todo microorganismo requiere de un sustrato para producir sus metabolitos, por lo que para cuantificar el sustrato consumido se llevó a cabo el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) realizando una valoración colorimétrica de hidratos de carbono, utilizando una curva patrón (0 a 100 mg/L) de glucosa (Tabla 6).

Tabla 6. Curva patrón de glucosa

Solución de Glucosa (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (mL)	H ₂ O destilada (mL)	Fenol (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	Concentración de Glucosa ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0	1.0	1	5	0
0.2	0.8	1	5	20
0.4	0.6	1	5	40
0.6	0.4	1	5	60
0.8	0.2	1	5	80
1.0	0	1	5	100

Cada muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, se tomó 1 mL del sobrenadante en un tubo de ensaye. Posteriormente a cada tubo se le adicionó 1 mL de solución de fenol al 5%, 5 mL de H₂SO₄ concentrado y se agitaron en vortex. Se dejaron reposar 5 minutos y se realizó la lectura en un espectrofotómetro UV/visible a 490 nm.

Es importante señalar que a partir del sobrenadante de los cultivos, se deben realizar diluciones (dependiendo la concentración inicial de azúcares adicionada al medio de cultivo) hasta encontrar la dilución adecuada, en donde los valores de absorbancia se encuentren dentro del intervalo de la curva patrón.

6.4. Determinación de parámetros cinéticos

Después de realizar las determinaciones analíticas para evidenciar la presencia de microorganismos fermentativos y metanogénicos así como de sus metabolitos, se seleccionaron las condiciones de crecimiento (medio de cultivo, temperatura y atmósfera) en las cuales se presentó la mayor producción de proteína así como de biogas. Bajo estas condiciones se determinaron los siguientes parámetros cinéticos: K_s, tiempo de

duplicación, producción específica y velocidad máxima de producción, con el objeto de caracterizar el cultivo cinéticamente.

6.4.1. Evaluación de distintas concentraciones de sustrato

Para la determinación de los parámetros cinéticos antes mencionados se evaluaron distintas concentraciones de melaza: 0.21, 0.42, 0.83, 1.3, 1.67 y 2.5 g/L con el fin de poder realizar los cálculos pertinentes. Estas cinéticas fueron monitoreadas cada 0, 50, 100, 150 y 250 horas; los métodos analíticos utilizados para la evaluación de crecimiento microbiano fueron: la determinación de proteína por el método de Bradford, la cuantificación de biogas por cromatografía de gases y la cuantificación de azúcares para conocer el consumo de la fuente de carbono.

6.5. Experimento de recuperación vía microbiana utilizando una columna empacada

El experimento de recuperación mejorada vía microbiana se llevó a cabo en una columna de vidrio, empacada con granulado de berea y saturada con hidrocarburo. Antes de empacarla, el granulado fue pasado por tamices del número 40 y 50 con el objeto de utilizar un polvo más fino para facilitar la saturación del granulado. La columna (2.5 cm x 22.5 cm) tiene una entrada en la parte inferior por donde se inyecta el medio de cultivo o la salmuera a través de una bomba peristáltica (8 mL/h) y una salida en la parte superior la cual está conectada a una botella serológica a través de la cual fue medido el volumen de gas producido en el sistema. Asimismo tiene una graduación volumétrica en la parte cilíndrica de ésta la cual permitirá visualizar la recuperación del crudo dentro de la columna (Figura 4). La columna fue empacada con 50 g de berea, saturada con hidrocarburo, mantenida a 70°C y una atmósfera de N₂/CO₂ durante 10 días.

Con el objeto de simular una recuperación secundaria, se bombeó una solución de salmuera al 25% hasta que ya no saliera hidrocarburo de la columna. Subsecuentemente, se inoculó con el consorcio seleccionado previamente y se alimentó con el medio de cultivo que tenía melaza como fuente de carbono. Durante 8 días de incubación se cuantificó el volumen de gas producido con cromatografía de gases; asimismo se recuperó y midió el hidrocarburo desplazado en la parte superior de la columna.

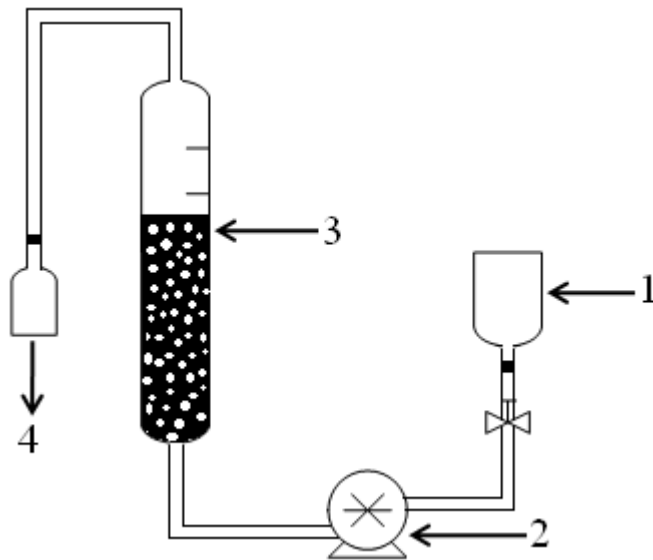


Figura 4. Columna empacada para el experimento de recuperación mejorada vía microbiana. (1) Alimentación del sistema (salmuera ó medio de cultivo); (2) bomba peristáltica con flujo de 8 mL/h; (3) columna graduada empacada con berea saturada de hidrocarburo y (4) colector de biogas producido en el sistema.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Evaluación de la formulación de los medios de cultivo y de las condiciones de crecimiento para evidenciar la presencia de microorganismos fermentativos y/o metanogénicos y sus metabolitos.

7.1.1 Observación microscópica de los cultivos anaerobios

Zobell en los años 40 demostró la existencia de una población microbiana rica y variada en aguas producidas en los pozos petroleros (Bryant et al., 1987). Sin embargo, los ambientes presentes en los yacimientos fueron considerados por mucho tiempo hostiles e inhóspitos para el crecimiento microbiano debido a las altas temperaturas, presiones y salinidades. Por el contrario, ciertos estudios han demostrado la existencia de microorganismos que habitan en el subsuelo, los cuales pueden crecer a temperaturas hasta de 125°C, pH de 1 a 11, en presencia o ausencia de oxígeno así como a salinidades hasta del 30% (Bass et Lappin-Scott, 1997).

Con el fin de observar cualitativamente el crecimiento de las muestras estudiadas, se realizó una observación microscópica para evaluar la presencia de microorganismos bajo el criterio de abundancia relativa. Dicha evaluación consistió en marcar con cruces la densidad de microorganismos observada en cada una de las distintas muestras (Figura 5).

Tiempo (días)	70°C, N ₂ /CO ₂			80°C, N ₂ /CO ₂			70°C, H ₂ /CO ₂			80°C, H ₂ /CO ₂		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	++++	+++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+++	+++
12	+++	++	++	++	+	+	+++	+	+	+	++	+
19	+++	++++	+++	+	+	+	+	+	+++	+	++	+
26	++	+++	++	+	+	+	++	+++	++	+	+	+
33	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	++	++	++++	++	+++	+	+++	++	+	+	+	+

Figura 5. Abundancia relativa de microorganismos en 3 diferentes medios incubados a 70° y 80° C y en atmósferas de N₂/CO₂ y H₂/CO₂. Abundancia relativa: muy abundante(5+), abundante(4+), regular(3+), poco(2+), muy poco(1+).

Se puede observar que la mejor temperatura de crecimiento fue a 70° C comparada con el crecimiento observado a 80° C en donde la presencia de microorganismos medida como abundancia relativa es menor independientemente de la atmósfera utilizada.

En ambas temperaturas se observó mayor abundancia de microorganismos a los 6 días de incubación; sin embargo a 80°C la presencia de microorganismos disminuyó notablemente después de este periodo y fue inconsistente en las atmósferas experimentadas.

En ambas atmósferas a 70°C se presentó la mayor abundancia de microorganismos a los 6 días de incubación; sin embargo únicamente los tratamientos con atmósfera de N₂/CO₂ a dicha temperatura se mantuvieron con presencia constante de microorganismos durante todo el tiempo de experimentación.

Summanen (1993) sugiere que los microorganismos anaerobios pueden desarrollarse en atmósferas con H₂, CO₂, y N₂ libres o mezclas. En el presente trabajo se evaluaron mezclas de estos gases obteniendo, hasta este punto, mejores resultados con la atmósfera de N₂/CO₂ (20/80) al igual que Takai y Horikoshi (2000) y Yamaguchi y Minami (1998).

Los resultados de la observación microscópica de los cultivos señalan que las condiciones más favorables en cuanto a crecimiento de microorganismos anaerobios fueron: temperatura de 70° C, atmósfera de N₂/CO₂ y al no observar una diferencia significativa en el efecto del medio sobre el crecimiento, se eligió preliminarmente al medio 2 en relación con el factor costo-beneficio por ser las condiciones más económicas para su aplicación, ya que el medio 2 consta únicamente de medio base y melaza como fuente de carbono.

7.1.2 Tinción de Gram

En la Figura 6 se muestran algunas micrografías de los microorganismos con el medio 2 (medio basal y melaza como fuente de carbono), atmósferas de N₂/CO₂ y H₂/CO₂ con temperatura de 70°C.

En las fotografías se muestran los microorganismos presentes a los 6 días de incubación (6 A y C) ya que en éste periodo se presentó la mayor población de microorganismos

durante el experimento. También se muestran las micrografías de los cultivos en el día 40 de incubación (6 B y D) ya que éste fue el último punto monitoreado en el experimento.

En la Figura 6 A se muestra el cultivo con atmósfera de N_2/CO_2 a los 6 días de incubación en el cual se observó una población de bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. En este mismo cultivo pero a los 40 días de incubación (Figura 6 B) se aprecia una población mucho menor la cual está compuesta únicamente por bacilos Gram negativos.

En la Figura 6 C se muestra el cultivo con atmósfera de H_2/CO_2 a los 6 días de incubación y se observó una población de pocos bacilos Gram negativos y algunos cocos Gram positivos. A los 40 días de incubación, en este mismo cultivo se observaron bacilos y cocos en su mayoría Gram negativos (Figura 6 D).

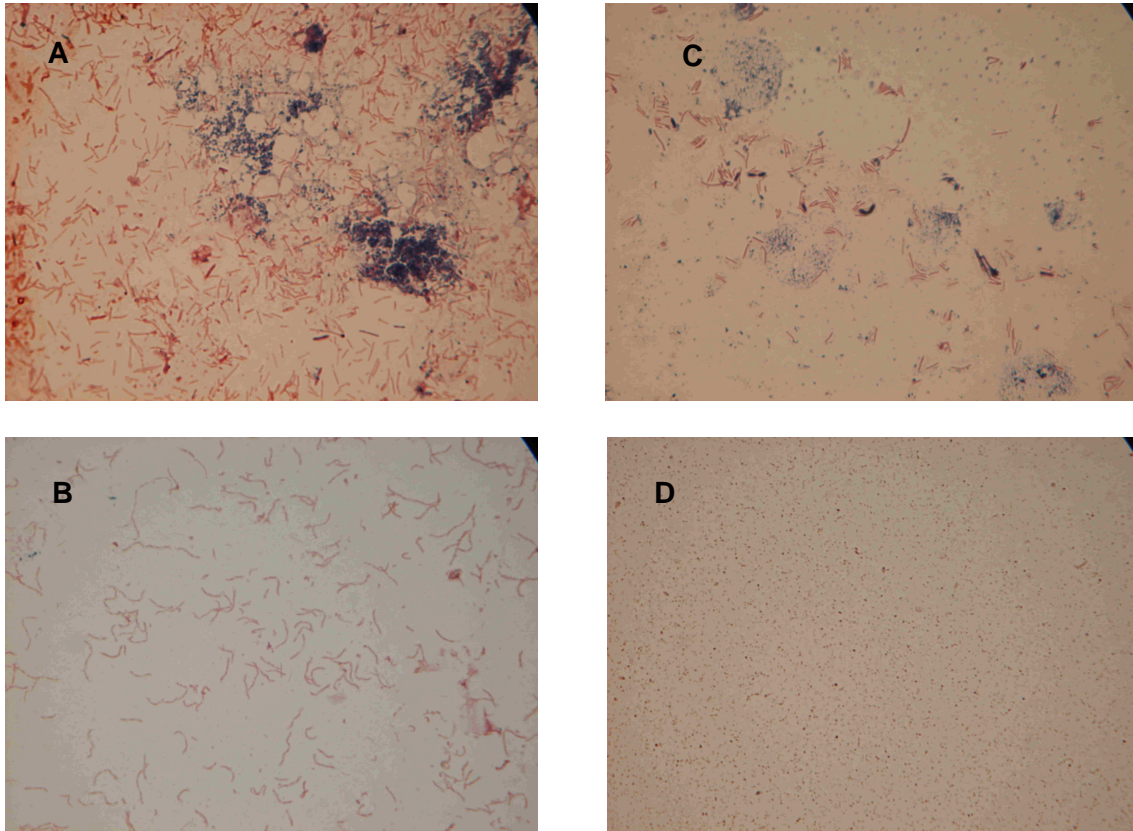


Figura 6. Observación microscópica de cocos y bacilos de los cultivos con tinción de Gram. **A)** 6 días de incubación, M2, atmósfera N_2/CO_2 , $70^\circ C$. **B)** 40 días de incubación, M2, atmósfera de N_2/CO_2 a $70^\circ C$, **C)** 6 días de incubación, M2, atmósfera de H_2/CO_2 incubados a $70^\circ C$, **D)** 40 días de incubación, M2, atmósfera de H_2/CO_2 a $70^\circ C$.

Es importante señalar que se observó un cambio en las poblaciones. Al principio, la mayoría fueron cocos Gram positivos y conforme transcurrió el tiempo de incubación de los cultivos, aumentó la presencia de bacterias Gram negativas. Por lo que se supone que los Gram negativos sobrevivieron y se duplicaron durante todo el periodo de experimentación debido a que, aunque su pared de peptidoglicana es muy fina, cuentan con una doble capa lipídica (Beveridge, 1990) la cual posiblemente contribuyó a su protección y crecimiento bajo las condiciones experimentadas en el presente trabajo.

Por otra parte, también pueden darse cambios de Gram positivo a negativo durante la fase de crecimiento exponencial ya que los microorganismos en ocasiones sufren lisis celular ó lesiones en su pared debido a las condiciones de crecimiento (temperatura, presión, inhibición) durante esta etapa; teniendo como consecuencia que aquellos microorganismos que en la fase lag presentaban un Gram positivo, en la fase exponencial sean Gram negativos (Beveridge, 1990).

Asimismo, aunque no se llevó a cabo la determinación de pH, se considera que un posible cambio de éste en el medio como un aumento de acidez pudo haber dañado la membrana celular y haber afectado en los resultados de la tinción.

Finalmente se puede describir el cultivo como un conjunto de bacilos cortos y alargados así como cocos en su mayoría Gram negativos. Esta descripción es muy general dado que nuestro cultivo es un consorcio que cuenta con diversos microorganismos los cuales no están identificados en cuanto a género y especie; sin embargo se sabe que en éste consorcio se encuentran bacterias fermentativas y arqueas metanogénicas que formaban parte del inóculo utilizado por (Muñoz et al., 2007) el cual fue el mismo que se utilizó para el presente trabajo. Las morfologías observadas son semejantes a las presentadas por Lal y colaboradores (2007), quienes usaron un consorcio microbiano termofílico compuesto por cocos y bacilos no esporulados Gram negativos incubados a 90°C. Los resultados obtenidos también son parecidos a los de Al-Blehed y colaboradores (1995), quienes realizaron experimentos de MEOR en laboratorio con muestras de aceite del reservorio de Shedgum en el Campo Ghawar de Arabia Saudita y después de realizar un análisis microscópico así como tinciones de Gram, describen que los microorganismos encontrados en éstas muestras fueron bacilos Gram negativos durante todo el tiempo de experimentación.

7.1.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Para evaluar el efecto de las condiciones sobre el crecimiento microbiano en el cultivo se cuantificó la concentración existente de biomasa medida como proteína en el sistema respecto al tiempo. En la Figura 7 se aprecia un cambio súbito en la producción de proteína entre el día cero y el día seis, por lo que el crecimiento que se obtuvo durante ese período se debió probablemente a la biotransformación de la melaza que se adicionó al medio como fuente de carbono (Boopathy, 2002), la cual es fácilmente degradada y utilizada adecuadamente por los microorganismos para su crecimiento (Figura 7). La melaza, además de contener azúcares, proporciona al medio algunos minerales y vitaminas necesarios para la actividad de los microorganismos (Boopathy, 2002), es por tanto una materia prima económica y muy nutritiva, lo cual la hace atractiva para usarla como fuente de carbono en procesos de recuperación de hidrocarburos.

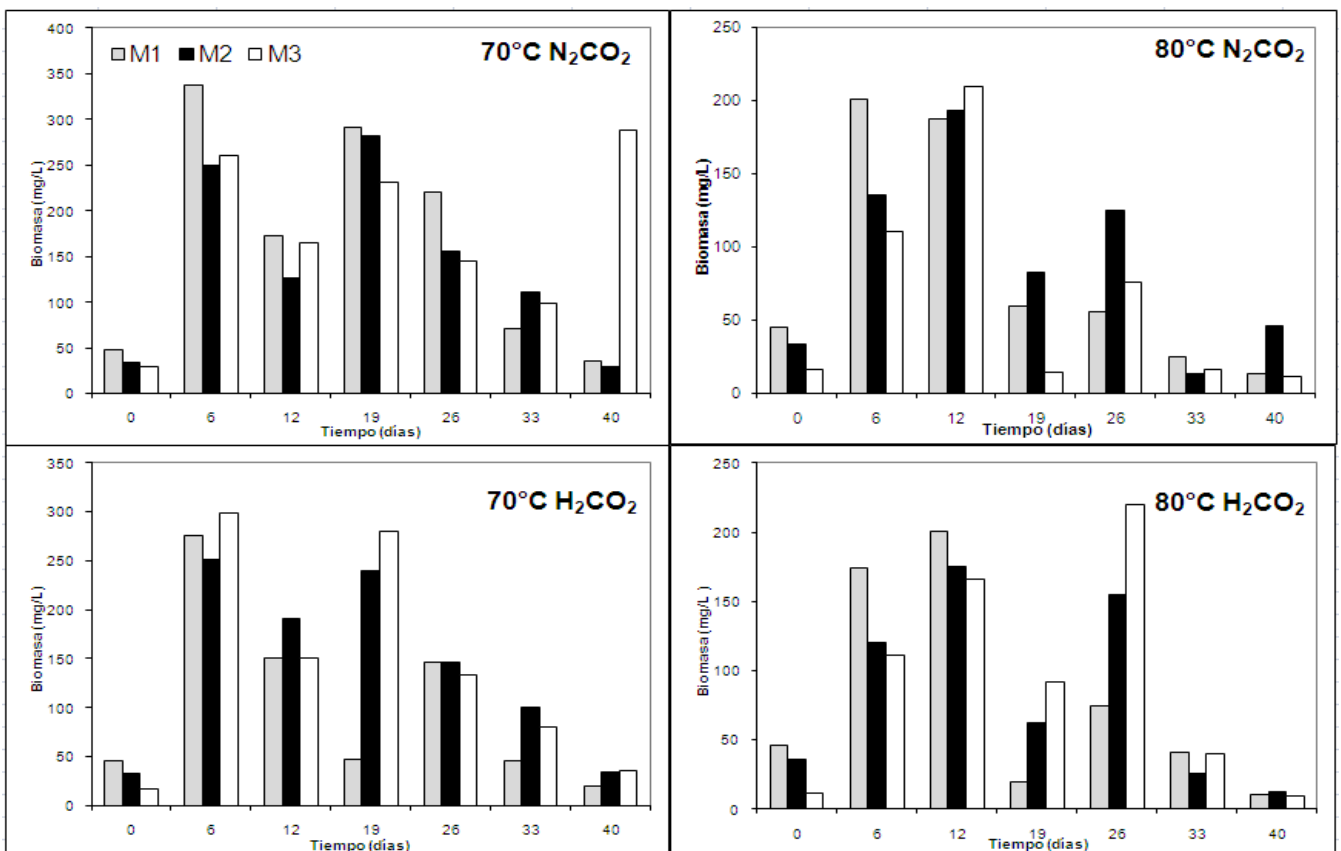


Figura 7. Biomasa generada en los cultivos anaerobios en 3 medios (M1, M2 y M3) incubados a 70° C y 80° C en atmósfera de N₂/CO₂, H₂/CO₂.

La temperatura fue un factor determinante en la producción de biomasa, ya que durante su cuantificación se presentó una mayor producción de biomasa a 70°C que a 80°C.

En cuanto a las atmósferas utilizadas y de acuerdo con la Figura 7, en las muestras a 70°C con atmósfera de H₂/CO₂ se obtuvieron buenos resultados (298.5 mg L⁻¹) durante la primera semana de incubación; sin embargo las mejores condiciones de cultivo para el crecimiento de microorganismos así como para la producción de biomasa, fueron aquellas que se utilizaron en el sistema de la muestra incubada en atmósfera de N₂/CO₂ a 70°C con el medio 1 (M1), llegando a un valor máximo de producción de proteína de 337.5 mg L⁻¹ a los 6 días. En la Tabla 7, se muestran las concentraciones de biomasa obtenidas en aquellos tratamientos que presentaron mayor producción de ésta. Los valores más elevados de biomasa fueron obtenidos a 70°C.

Tabla 7. Valores máximos de biomasa obtenidos durante la primera semana de experimentación a 70 ° C.

Medio	Atmósfera	Biomasa (mg L ⁻¹)	Tiempo (días)
1	N ₂ /CO ₂	337.5	6
2	N ₂ /CO ₂	249.2	6
3	H ₂ /CO ₂	298.5	6
2	H ₂ /CO ₂	250.9	6

Por último, en cuanto al medio, la máxima producción de biomasa fue con el medio 1; sin embargo no presenta gran diferencia con el medio 2, más que el medio 2 presenta una relación costo-beneficio mayor que el medio 1 ya que su preparación requiere únicamente de sales minerales y melaza como fuente de carbono.

Si bien los resultados obtenidos con el medio 2 no fueron los máximos, éstos no se encuentran lejanos del medio 1, por lo que se propone la utilización del medio 2 debido a que es más económico e igualmente factible y aplicable que el medio 1.

7.1.4 Producción de CO₂

La tendencia obtenida durante la producción de dióxido de carbono fue directamente proporcional al tiempo de incubación, en casi todos los casos experimentados. En la Figura 8 se observa que a los seis días de incubación se detectó este gas en alta concentración en todos los casos; ésta fue incrementándose de tal manera que en condiciones de 70°C y N₂/CO₂, se presentó la máxima producción de gas, la cual fue de 27 milimoles de CO₂ por litro de medio.

En la Figura 8, se puede apreciar que con el medio 2 (M2) se obtuvieron los mismos o mejores resultados que con el medio 1 (M1). Por lo tanto se sugiere el uso de este medio para la producción de gases ya que la producción de estos es una de las características más importantes para incrementar el porcentaje de recuperación (Almeida, 2004).

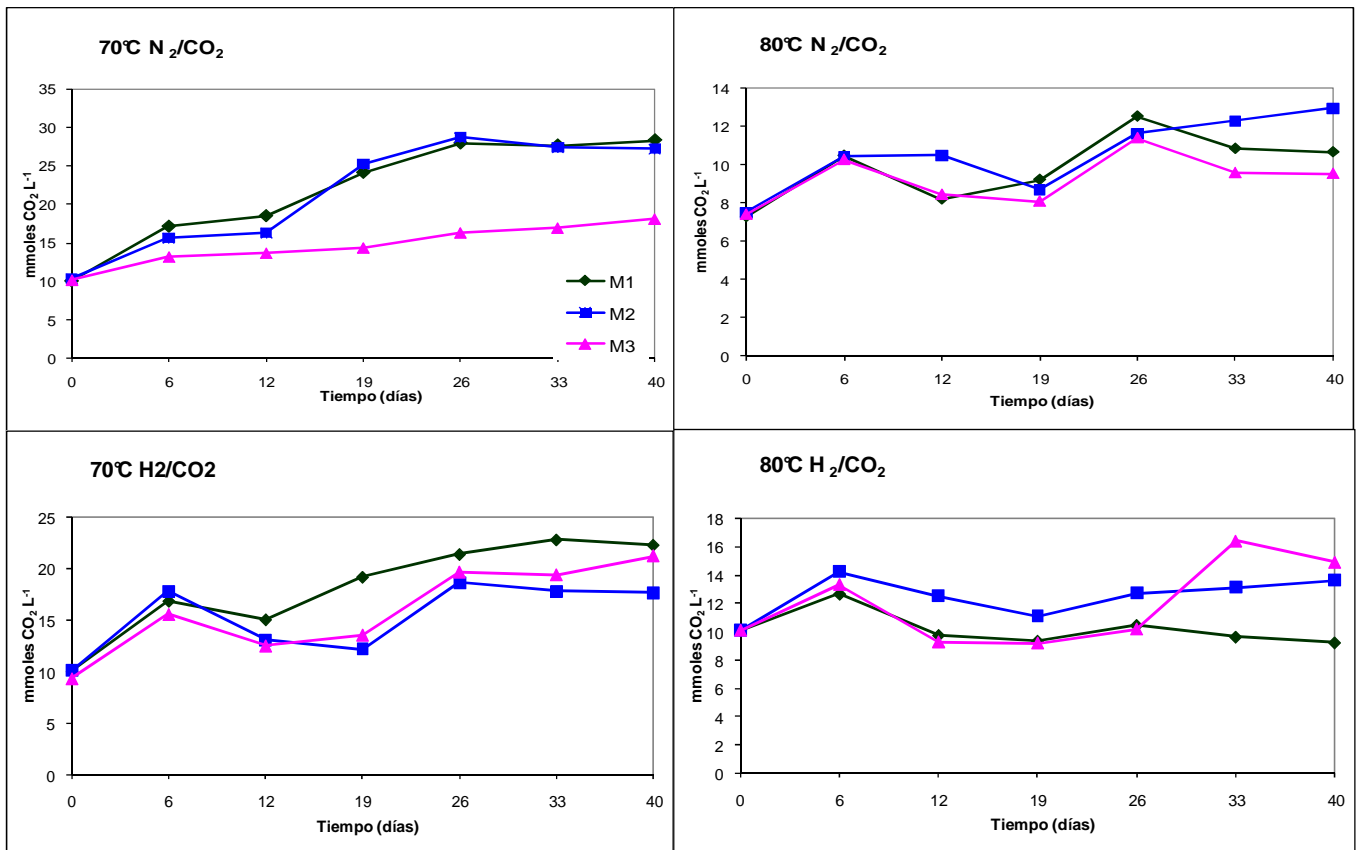


Figura 8. Producción de CO₂ en los cultivos anaerobios con los 3 medios propuestos (M1, M2 y M3) incubados a 70° C y 80° C en atmósfera de N₂/CO₂, H₂/CO₂.

Para fines prácticos de MEOR se considera la importancia de favorecer la producción de este gas, por lo que se propone la atmósfera N₂/CO₂ como la más adecuada por ser la que presentó mayor producción.

En la Tabla 8, se puede observar que los parámetros cinéticos calculados (producción específica, velocidad máxima de producción y producción neta de CO₂) fueron similares en el medio 1 y 2, en tanto que el medio 3 presenta la menor velocidad de producción así como la mínima producción específica de CO₂, por lo que esta última opción cinéticamente no es viable ya que si se quisiera aplicar un experimento en laboratorio y/o en planta piloto y se utilizara el medio 3, los resultados obtenidos por efecto del medio de cultivo y del gas producido serían menos eficientes que los obtenidos al utilizar cualquiera de los otros dos medios, esto en función de los parámetros cinéticos obtenidos de la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros cinéticos en la producción de CO₂

Medio	Condiciones	Producción específica de CO ₂ (mMol CO ₂ g _{prot} ⁻¹ d ⁻¹)	Velocidad Máxima de producción de CO ₂ (mMol CO ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	Producción neta de CO ₂ (mMol CO ₂ L ⁻¹)
1	N ₂ /CO ₂ , 70°C	1.94	0.7073	21.9499
2	N ₂ /CO ₂ , 70°C	2.55	0.7174	21.5346
3	N ₂ /CO ₂ , 70°C	0.744	0.4515	14.6621

El cálculo de los parámetros presentados en la Tabla 8 se realizó con el fin de corroborar no solo gráfica sino matemáticamente que las condiciones elegidas fueron las adecuadas, ya que estas presentaron los mejores resultados en cuanto a la producción de CO₂.

7.1.5. Producción de CH₄

Como parte de la determinación de gases producidos por los microorganismos fermentativos y metanogénicos se cuantificó la concentración de metano producido; sin embargo éste gas no se hizo presente en ningún momento durante la determinación. Su tiempo de retención es de 3.5 minutos, pero no se detectó concentración alguna de metano en ninguno de los cultivos bajo ninguna de las condiciones de temperatura y atmósfera experimentadas.

7.1.6. Determinación de Azúcares

Se llevó a cabo la cuantificación de azúcares reductores por el método fenol – sulfúrico, de todos los sistemas; sin embargo sólo se reportan los resultados de los sistemas cultivados a 70° C con atmósfera de N₂/CO₂, debido a que bajo estas condiciones se presentó un mayor crecimiento microbiano en relación con los sistemas cultivados a 80° C y no solo en ésta determinación sino también en la de proteína y gas.

La determinación de azúcares se llevó a cabo con el objeto de verificar el consumo microbiano de la melaza. En la tabla 9, se puede apreciar que el consumo es similar en los tres distintos medios evaluados, consumiendo en promedio un 50% de la concentración inicial de azúcar, esta evidencia concuerda con los resultados observados en abundancia relativa y producción de biomasa.

Tabla 9. Determinación de azúcares

Medio de cultivo	Atmósfera	Concentración inicial (mg L ⁻¹)	Concentración final (mg L ⁻¹)	Consumo (%)
1	N ₂ /CO ₂	4015.94	1855.65	53.79
2	N ₂ /CO ₂	5217.1	2476.10	52.53
3	N ₂ /CO ₂	4878.26	2354.34	51.73

La melaza fue asimilada satisfactoriamente por los microorganismos, ya que con el consumo de la mitad del sustrato disponible, fueron capaces de crecer, producir biomasa y biogas (CO₂) obteniendo buenos resultados y permitiendo elegir las condiciones mas adecuadas para su desarrollo.

7.2. Determinación de parámetros cinéticos.

De acuerdo con la evaluación de la formulación de los medios de cultivo y de las condiciones de crecimiento, se determinó que las condiciones bajo las cuales se presentó el mejor crecimiento de los microorganismos para MEOR fueron a 70°C, atmósfera N₂/CO₂ y utilizando el medio 2 (medio base y melaza) como fuente de carbono y energía. Posteriormente, bajo estas mismas condiciones, se realizó una cinética de experimentación (por triplicado) con el mismo inóculo utilizado para la evaluación del crecimiento

y la cuantificación de metabolitos, durante un lapso aproximado de 10 días (250 horas). Se determinó nuevamente la producción de biomasa, de CO_2 , y la glucosa residual.

Debido a que el objetivo en este punto fue la determinación de parámetros cinéticos se evaluaron distintas concentraciones de sustrato, esto con el fin de analizar tanto rendimientos, producción y consumo en un rango de concentraciones, el cual se basó en lo reportado por Muñoz y col., (2007).

En la Figura 9 se muestra el comportamiento de la producción de gas medido como CO_2 , el consumo de la fuente de carbono (glucosa proveniente de la melaza) y la producción de biomasa cuantificada como proteína. Se observa que a las 100 horas el cultivo presentó la mayor producción de biomasa, así como el mayor consumo de azúcares, y la producción de CO_2 fue alta, aunque no la máxima.

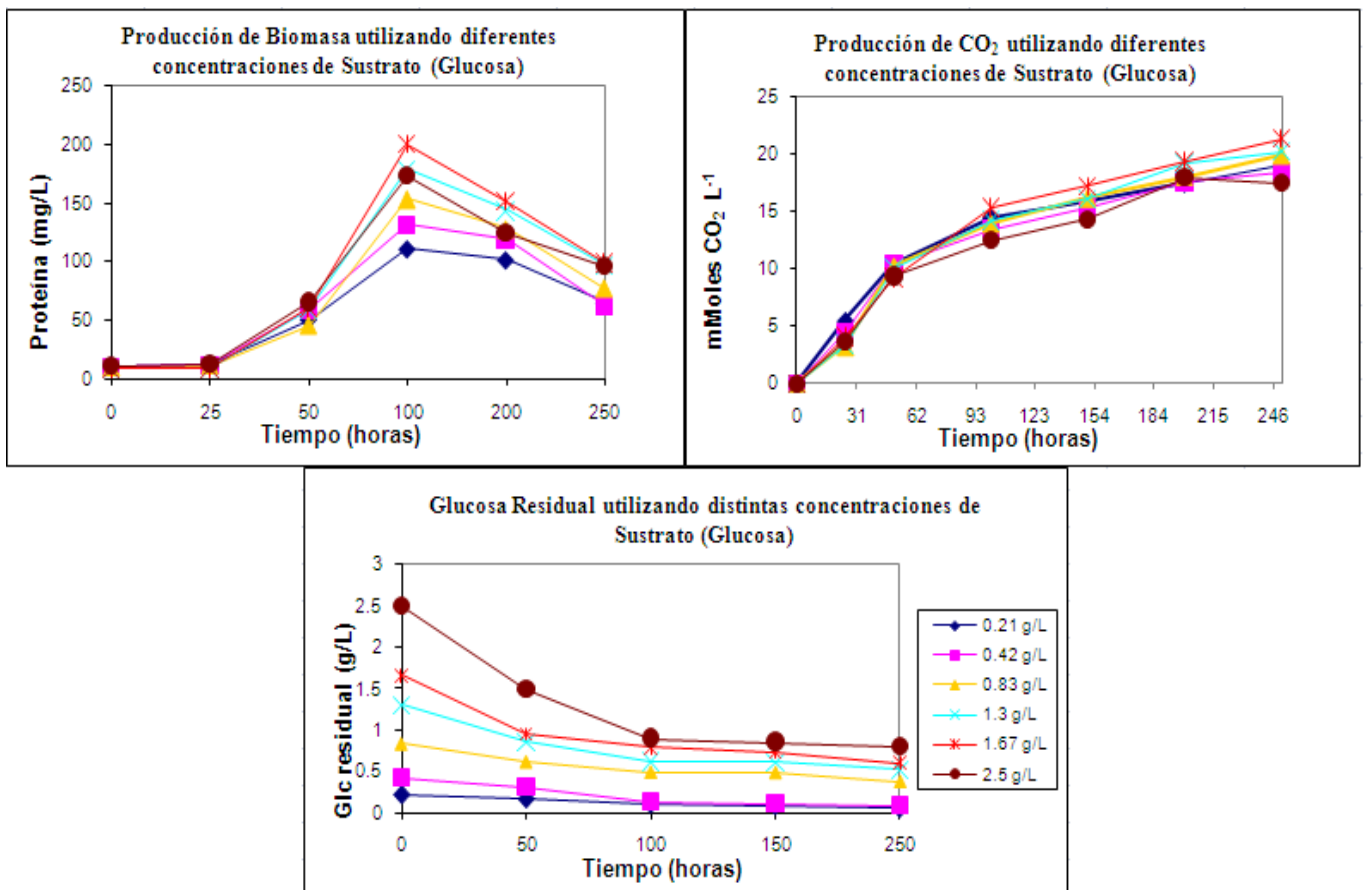


Figura 9. Evaluación simultánea de biomasa, CO_2 y azúcar residual en los cultivos anaerobios a 70°C , N_2/CO_2 , medio 2 en distintas concentraciones de sustrato.

Analizando detalladamente la Figura 9, la producción de biomasa presenta una relación estrecha y lógica respecto al consumo de sustrato, ya que los microorganismos consumieron cerca del 70% del sustrato inicial durante las primeras 100 horas, lo cual fue suficiente para que, en este mismo intervalo, presentaran la producción máxima de biomasa y continuaran con la generación de CO₂.

La producción de biogas presentó una relación directa con respecto al tiempo de incubación, a mayor tiempo mayor producción de CO₂. Como se puede observar ésta tendencia continuó sin presentar disminución alguna en ninguna de las concentraciones durante el periodo evaluado. Este continuo incremento pudo ser debido a que el consumo del sustrato se dirigió principalmente a la generación de gas, lo cual es característico de microorganismos anaerobios. A partir de los datos de la Figura 9, se determinaron los parámetros cinéticos en función de la concentración de la fuente de carbono y, utilizando la fase logarítmica, se determinó la constante de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td), los cuales se reportan en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros cinéticos en función de la concentración de la fuente de carbono

Concentración teórica de glucosa (g/L)	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)	Rendimiento de biomasa Y _{xs}	Velocidad máxima de producción de CO ₂ (mmol/L*h)	Producción específica de CO ₂ (mmol/g _{proteína} *h)
0.21	0.02910	23.8120	0.33750	0.06855	0.61750
0.42	0.03177	21.8168	0.15818	0.06855	0.52244
0.83	0.03481	19.9110	0.14671	0.07625	0.49799
1.3	0.03910	17.7270	0.11332	0.07843	0.43928
1.67	0.04101	16.8986	0.08448	0.08220	0.41125
2.5	0.03527	19.6498	0.04951	0.06877	0.39839

La velocidad máxima específica de crecimiento determinada experimentalmente fue de 0.04101 h⁻¹, la cual es cercana al 0.051 h⁻¹ reportado para *Azotobacter vinelandii* (Priego et al., 2001), siendo éste último un microorganismo quimioorganoheterótrofo habitante de suelos (Espín, 2002). Wood y Kelly (1991) reportaron una velocidad específica de 0.038 h⁻¹ para *Thiomicrospira thyasirae*, un microorganismo halófilo habitante de ambientes marinos.

Sin embargo, es preciso señalar que el cultivo del presente trabajo es mixto, es decir, lo conforman diversos microorganismos tales como bacterias y arqueas (Muñoz et al., 2007) de los cuales, como ya se había mencionado anteriormente no se conoce la especie ni género de cada uno, por lo que no se puede realizar una comparación más detallada o certera en cuanto a la velocidad específica de crecimiento. Por lo tanto la μ_{max} obtenida es aparente y solo característica del cultivo utilizado en el presente trabajo.

El tiempo de duplicación obtenido fue, en promedio, de 20 h. Este es un valor intermedio, ya que se han reportado sistemas anaerobios fermentativos utilizados para el tratamiento biológico de aguas residuales con tiempos de duplicación de 0.125 d a 40°C (Arnaiz et al., 2000) y por otro lado, microorganismos del género *Methanosarcina* presentan tiempos de 1.5 a 2 días a 55°C (Zeikus et al., 1972). Los tiempos de duplicación de los microorganismos fermentativos son menores a los metanogénicos, debido a que estos requieren mayor tiempo de adaptación en el medio para comenzar a reproducirse en el medio (Arnaiz et al., 2000).

Los rendimientos de biomasa respecto al sustrato fueron del 4% al 30%, dichos valores concuerdan hasta cierto punto con los reportados para algunas bacterias anaerobias, los cuales van del 2% al 10% (Atkinson et Ferda 1991). Es necesario mencionar que los microorganismos anaerobios reportados por Atkinson y Ferda (1991) cuentan con distintas características metabólicas y se desarrollan en diversos ambientes, por lo tanto, dadas las características del cultivo de este trabajo, no se pueden excluir los rendimientos obtenidos cercanos al 30% y son igualmente válidos.

La determinación de la constante de saturación se realizó gráfica y matemáticamente, como se muestra en la Figura 10, obteniendo una $K_s=0.095$ g/L, este resultado se encuentra dentro del amplio intervalo reportado por Atkinson y Ferda (1991) para anaerobios; por lo que es importante recordar que la obtención de esta constante depende del sustrato utilizado y del metabolismo de cada microorganismo. Sin embargo el valor de K_s obtenido indica que los microorganismos del cultivo fueron sumamente afines al sustrato.

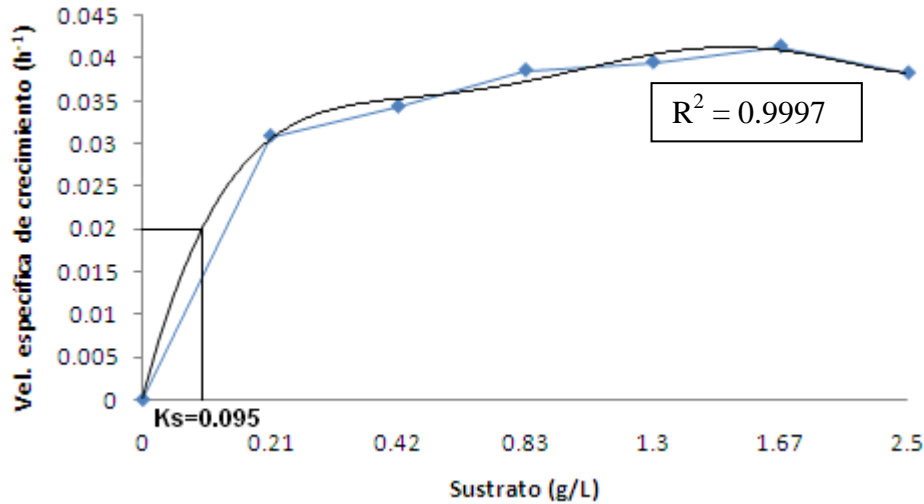


Figura 10. Curva de crecimiento de microorganismos anaerobios a 70°C, N₂/CO₂, medio 2 con distintas concentraciones de sustrato.

Los parámetros cinéticos obtenidos en el presente trabajo son de suma importancia ya que pueden servir en un futuro para tener una referencia cinética de un cultivo con las mismas características y/o para realizar una simulación del sistema a través de un modelo matemático.

7.3. Experimento de recuperación vía microbiana utilizando una columna empacada

Durante el experimento de recuperación, se determinó la porosidad del granulado de berea, después la simulación de recuperación secundaria con salmuera y por último la recuperación mejorada vía microbiana, durante la cual se llevó a cabo un monitoreo de la producción de biomasa y de gas bajo las condiciones de 70°C, atmósfera de N₂/CO₂ e inyección de inóculo con medio 2 (medio basal y melaza). Por último se determinó el porcentaje de aceite recuperado debido a actividad microbiana.

7.3.1. Porosidad del medio

Otro factor importante a considerar para la recuperación del crudo, es la porosidad del medio, la cual es un porcentaje de espacios vacíos respecto al volumen de la roca que indicará el volumen de fluidos que pudiera contener el reservorio (<http://www.cbh.org.bo>). Por lo tanto de esta depende tanto la penetración de los microorganismos en el pozo (en este caso en la columna) como el efecto que éstos tienen sobre la recuperación del hidrocarburo. La porosidad depende del tipo de roca del yacimiento y las más comunes son: arenisca, berea, calcita, entre otros (Sayyoub et al., 1992). Se han reportado pozos compuestos por una o varias de las rocas mencionadas y dependiendo de sus características geológicas la porosidad varía del 18 al 35 % (Sayyoub et al., 1992).

La porosidad de la berea con la que se empacó la columna fue del 20% (Tabla 11); dicho valor se encuentra dentro de lo reportado tanto por Sayyoub y colaboradores (1992) como por Lal y colaboradores (2007) quienes realizaron un ensayo de recuperación con berea y reportaron una porosidad del 19%.

Tabla 11. Cálculo de la porosidad del medio.

Longitud (cm)	Área (cm ²)	Peso en seco (g)	Peso saturado con salmuera (g)	Volumen Poroso (cm ³)	Densidad salmuera (g/cm)
7.3	35.84	52.7	60.1	35.83	1.02

$$\phi = \frac{W_{SAT} - W_{SEC}}{M_T} = \left| \frac{60.1g - 52.7g}{35.83cm^3} \right| \left| \frac{cm^3}{1.02g} \right| = 0.2024$$

$$\text{Porosidad } \phi = 20.24 \%$$

Donde:

ϕ = Porosidad

W_{SAT} = Peso del núcleo saturado con salmuera (g)

W_{SEC} = Peso del núcleo seco (g)

M_T = Masa total del núcleo = Vol. Total * Densidad de salmuera [=] g

7.3.2. Recuperación secundaria con salmuera

Antes de la inyección del medio inoculado con microorganismos, se realizó una inyección de salmuera al 25% con el objeto de simular una recuperación secundaria. En este proceso se recuperaron 5 mL que corresponden a un 31.25% del aceite inicial con el que fue saturada la columna.

7.3.3. Recuperación mejorada vía microbiana

Posterior a la recuperación secundaria, se incorporó el medio de cultivo con los microorganismos a la columna como se muestra en la Figura 11 y se monitoreó el sistema a través de la cuantificación de proteína y CO₂ producido durante un periodo de 8 días.



Figura 11. Experimento de recuperación

7.3.3.1. Cuantificación de proteína

El primer parámetro a monitorear fue la producción de proteína mostrada en la Figura 12 en donde se observa una muy ligera fase de adaptación así como una tendencia exponencial a las primeras 150 h manteniendo posteriormente una fase estacionaria.

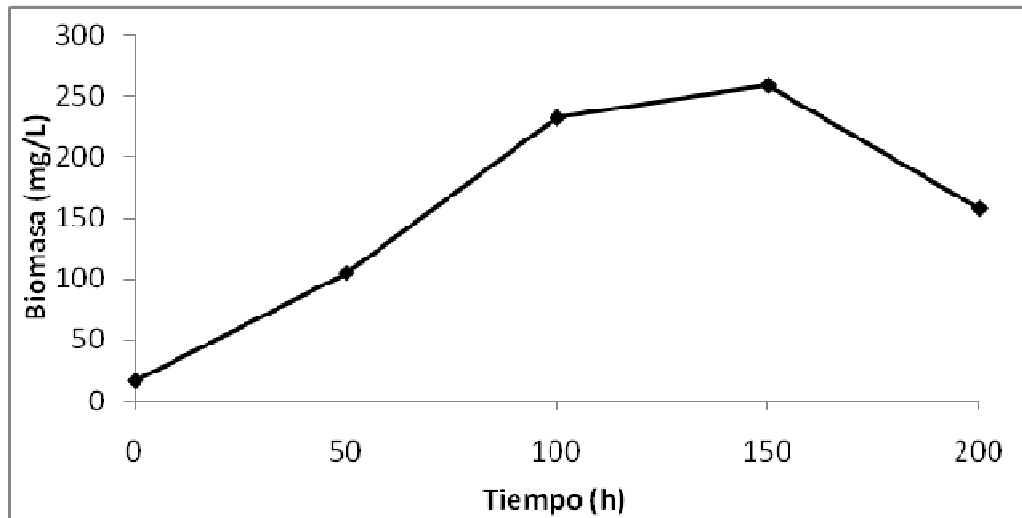


Figura 12. Biomasa generada en el sistema anaerobio en una columna empacada con berea como medio poroso incubado a 70°C en atmósfera de N_2/CO_2 .

La mayor producción de biomasa se presentó a las 150 h, siendo ésta de 259.35 mg/L observando así que la presencia tanto del granulado como del crudo no fue un factor limitante para los microorganismos, ya que de acuerdo a los resultados tuvieron una rápida adaptación al medio, lo cual puede ser resultado de una buena y rápida biotransformación de la melaza, esto debido a que, de acuerdo con Stanier (1986), las bacterias que crecen en presencia de hidrocarburo y una fuente de carbono adicional fácilmente asimilable, como en nuestro caso puede ser la melaza, primero utilizan ésta.

7.3.3.2. Producción de gas

La producción de CO_2 presentó una dependencia directa entre el tiempo y los gramos de gas producidos por litro de medio. Cabe resaltar que a las 0 h ya se contaba con cierta producción de gas ya que pudo ser que el inóculo estuviera iniciando su fase exponencial presentando por tanto cierta producción de gas (Figura 13). Asimismo se observa que la producción de gas se incrementa a través del tiempo de tal manera que a las 200 h se produce cerca de 1 gramo de CO_2 por litro de medio.

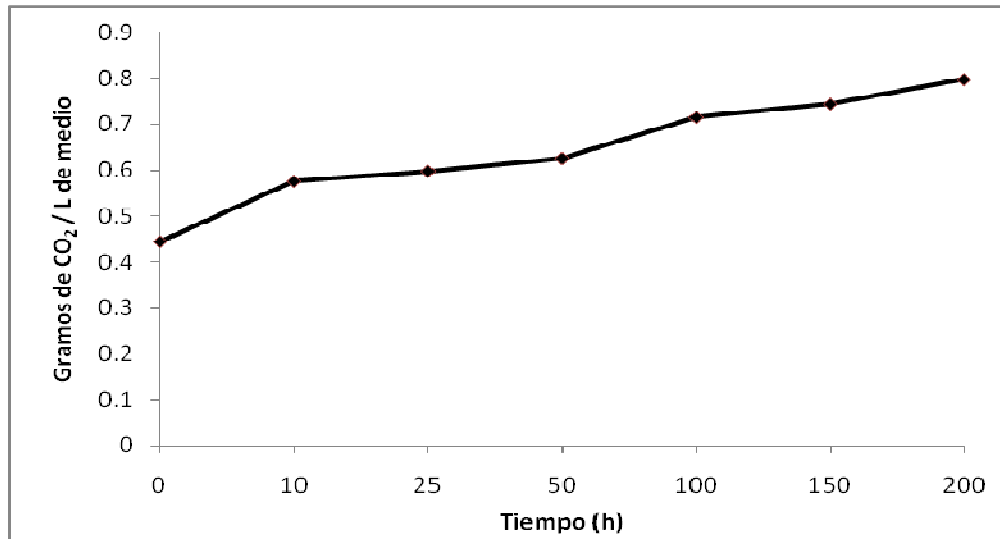


Figura 13. Producción de CO₂ en el sistema anaerobio en una columna empacada con berea como medio poroso incubado a 70°C en atmósfera de N₂/CO₂

Asimismo los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 12., observando una alta producción y velocidad de producción de CO₂, presentando a la vez un bajo rendimiento de biomasa (5%). Esto puede ser debido a que la melaza fue aprovechada para producir preferentemente gas que biomasa, ya que se tuvo una concentración inicial de azúcar en el medio fue de 5424.63 mg/L y una final fue de 2911.52 mg/L.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la producción de CO₂ en la columna empacada

Velocidad máx.de producción de CO ₂ (mmol/L*h)	Producción específica de CO ₂ (mmol/g _{proteína} *h)	Rendimiento Y _{xs}
0.1820	0.7017	0.0565

7.3.4. Porcentaje de recuperación de crudo por actividad microbiana

El objeto de cuantificar biomasa y gas fue el de asociar que dicha recuperación es consecuencia del metabolismo microbiano, ya que tanto la biomasa como el CO₂ fueron cuantificados a partir de la inyección del cultivo.

Al final del experimento, se obtuvo una recuperación de 2 mL correspondientes al 12.5% del aceite inicial con el que se saturó la columna; por lo que considerando la recuperación secundaria y microbiana se obtuvo un 43.3% de aceite recuperado.

El porcentaje de recuperación mejorada obtenido en el presente trabajo (12.5%) coincide con lo reportado por Almeida y colaboradores (2004), quienes realizaron un experimento a nivel laboratorio con granulado y aceite utilizando diferentes consorcios de *Bacillus licheniformis*, *B. polymoxa*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio* sp; los cuales presentaron un rango de recuperación mejorada entre el 11 y el 18%.

Asimismo, Lal y colaboradores (2006), realizaron un estudio experimental con consorcios de bacterias termofílicas como *Thermococcus* sp. y *Thermotoga* sp. con un núcleo de brea saturado e incubado a 90°C, obteniendo una recuperación mejorada del 8.93% respecto al aceite inicial.

En la aplicación en campo de MEOR, se han reportado porcentajes de recuperación mejorada entre el 12% hasta el 30 % dependiendo las características fisicoquímicas, biológicas y geológicas del yacimiento. (Al-Blehed et al., 1995; Behlulgil et al., 1991).

Algunos autores coinciden en que el CO₂ generado por los microorganismos es el principal impulsor de la recuperación mejorada, ya que no solo aumenta la presión del sistema sino que también disminuye la viscosidad del crudo permitiéndole salir fácilmente (Almeida et al., 2004; Jack et al., 1985). Como antecedente de lo antes mencionado, se tiene que en recuperaciones secundarias o asistidas se inyecta CO₂ al yacimiento (Sánchez et al., 2008).

De acuerdo con los resultados en el presente trabajo, se observa que el biogas es un factor importante en la recuperación mejorada de hidrocarburo y que éste es el principal responsable de la recuperación del crudo.

La recuperación de hidrocarburos vía microbiana es una buena alternativa, porque no solo se tiene producción de gas sin necesidad de inyectarlo sino que también están presentes otros metabolitos los cuales incrementan la cantidad de aceite recuperable de pozos fríos. Asimismo esta tecnología da la oportunidad de evaluar una posible recuperación en yacimientos que se consideran ya secos.

8. CONCLUSIONES

- Los microorganismos anaerobios en condiciones de temofilia y halofilia, mostraron capacidad para desarrollarse y producir metabolitos utilizando melaza como fuente de carbono.
- El mayor crecimiento de microorganismos anaerobios fermentativos, así como la producción de metabolitos, se presentaron a los seis días de incubación.
- La temperatura fue un factor determinante para la producción de CO₂, presentando los mejores resultados a 70°C.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, la formulación de las condiciones más adecuadas para inducir el crecimiento de microorganismos fermentativos son: Medio 2, 70°C y atmósfera de N₂/CO₂.
- La producción máxima de biomasa fue de 200 mg/L con un rendimiento de biomasa respecto al sustrato de Y_{xs} del 11%.
- La velocidad máxima de producción de CO₂ fue de 0.083 mmol/L*h y una producción específica de CO₂ de 0.42 mmol/g_{proteína}*h.
- La velocidad máxima específica de crecimiento (μ) fue de 0.04101 h⁻¹ con un tiempo de duplicación de 16.8 días.
- La constante de saturación (Ks) fue de 0.095 g/L.

- El granulado de berea no presentó efecto sobre la producción de biomasa pero sí en la producción de CO₂, ya que ésta última disminuyó un 30% respecto a la cantidad de gas producida durante las cinéticas de crecimiento previas al experimento.

- En el experimento de laboratorio se obtuvo una recuperación de aceite de 12.5% por efecto de la actividad microbiana, lo cual indica viabilidad de la aplicación de MEOR

9. BIBLIOGRAFÍA

Aizprúa, C. y Rodríguez, R. (2006) Dióxido de carbono: almacenamiento y utilización en campos petrolíferos. Madrid, España.

Almeida, P.F., Moreira, R.S., Almeida, C.C., Guimaraes, A.K., Quintella, C., Esperidia, C.A. and Taft, C.A. (2004) Selection and application of microorganisms to improve oil recovery. Pp. 319-325. Eng. Life Sci. No. 4.

Al-Blehed, M.S., Sayyoub, M.H., Shoeb, H.A., Awwad, A.M., Desouky, S.M. and Hemeida, A.M. (1995) Laboratory investigation of microbial enhanced oil recovery. King Saud University. Saudi Arabia.

Arnaiz, C., Isac, L. y Lebratu, J. (2000) Tratamiento biológico de aguas residual. Revista Tecnología del agua. Universidad de Sevilla, España.

Atkinson, B. and Ferda, V. (1991) Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Ed. Stockton Press. United Kingdom.

Bass, C. and Lappin-Scott, H. (1997) The bad guys and the good guys in petroleum microbiology. Oilfield Review: Volume 9. Pp. 19-25. University of Exeter, England.

Behlulgil, K., Mehmetoglu, T. and Donmez, S. (1991) Application of microbial enhanced oil recovery technique to a Turkish heavy oil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:833-835.

Beveridge, T.J. (1990) Mechanism of gram variability in select bacteria. Journal of bacteriology. Pp. 1609-1620. Ontario, Canada.

Blinder, Alan. (1979) Economic Policy and the Great Stagflation. New York: Academic Press. Pp.431-440.

- Boopathy, R. (2002) Anaerobic biotransformation of carbon tetrachloride under various electron acceptor conditions. *Bioresource Technology*, **84** (1): 69-73
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem* 72: 248-254.
- Bryant, R. S. (1989) MEOR data base and evaluation of reservoir characteristics for MEOR. National Institute for Petroleum and Energy Research. Society of Petroleum Engineers. Pp. 567-578. Oklahoma, USA.
- Bryant, R.S., Bailey. S, Stepp K.A., Evans D.B., Parli A.J. and Kolhatkar R.A. (1987) "Biotechnology for Heavy Oil Recovery". Oklahoma, USA.
- Bryant, R. S. and T. E. Burcheld. (1989) Review of microbial technology for improving oil recovery. *SPE Reservoir Eng. J.* 4(2):151.
- Clark, J.B., D.M. Munnecke; and G.E. Jenneman (1989) In situ microbial enhancement of oil production. *Dev. Ind. Microbial.* 22: 695-701.
- Clive, E. (1990) *Microbiology of extreme environments*. Mc. Graw Hill. Pp. 113-129.
- Cobeñas, R.H. y S. L. Hogg: (1998) Mejoramiento de la producción de petróleo mediante el uso de aplicaciones biotecnológicas. Instituto Argentino de Gas. *Petrotecnia*. Pp. 60-65.
- Curtin, V. L. (1983) Molasses in animal nutrition Ambler, Pennsylvania 19002. This Article Was Excerpted From Copyright C National Feed Ingredients Association West Des Moines, Iowa. Vol. 2. Pp. 1-11.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. (1956) Colorimetric method for determination of sugar relates substances. *Anal. Chem.* 28 (3): 350-356. From an African Oil-Producing Well. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 45 (2):308-314.
- Espín, G. (2002) *Biología de Azotobacter vinelandii*. Instituto de biotecnología, UNAM.

E.U. Pat. No. 4,905,761. Bryant, March 6, 1990.

E.U. Pat. No. 2,807,570 Updegraff September 24, 1957.

Glosario PEMEX. Términos y definiciones. www.ri.pemex.com/files/glosario07.pdf

Gottschalk, G. (1986) Bacterial Metabolism. Chapter 6. Anaerobic metabolism. Ed. Springer-Verlag. Second Edition. Pp.249-272, 252-260.

Hebert RA and Codd GA. (1986) Microbes in Extreme Environments. McGraw Hill-Interamerican London pp. 216-270.

Hitzman, D. O. (1983) Petroleum microbiology and its role in enhanced oil recovery, Proc. of the 1982 International Symposium on MEOR, NTIS, Spring. eld, VA. Pp. 162.

Horikoshi K. (1996) Alkaliphiles from an industrial point of view. FEMS Microbiol. Rev. 18: 259-270.

Jack, T.R. (1985) Application of bacteria to the *in situ* recovery of heavy oil. Proc. Of 3rd. Int. Conf. on heavy crude and tar sands. Long Beach, California. Pp. 745-757.

Jang, Long-Kuan., Chang, P., Findley, J. and Yen, Teh Fu. (1983) Selection of bacteria with favorable transport properties through porous rock for the application of microbial enhanced oil recovery. Applied and Enviromental Microbiology. 46(5): 1066-1072.

Jang, Long-Kuan., Sharma, M.M. and Yen, T.F. (1984) The transport of bacteria in porous media and its significance in microbial enhanced oil recovery. University of Southern California.

Jeanthon C., Nercessian O., Corre E. and Grabowski-Lux A. (2005) Hypertermophilic and methanogenic archaea in oil fields.. In Petroleum microbiology. Eds Ollivier B. y Magot M. ASM Press USA.

Khire, J. M., and M. I. Khan. (1994) Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanisms of microbial enhanced oil recovery. *Enzyme Microb. Technol.* 16:170–172.

Khire, J. M., and M. I. Khan. (1994) Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 2. Microbes and the subsurface environment for microbial enhanced oil recovery. *Enzyme Microb. Technol.* 16:258–259.

Kuznetsov, S.T.; Ivanov, M.V. and Lyalikova, N.N.L. (1963) Introduction to Geological Microbiology. Chapter V. Ed. McGraw-Hill. New York.

Lacey, J. (1990) Isolation of Biotechnological organism from nature Labeda (ed) McGraw Hill Publishing Co. USA. pp.141-161.

Lal, Banwari., Ramajaneya, M., Agnihotri, A., Kumar, A., Prasad, M., Singh, N., Karan, R., Kishen, S. and Ram, T. (2007) Process for enhanced recovery of crude oil from oil wells using novel microbial consortium. U.S. Patent 0092930A1.

Levett, P. (1991) Anaerobic Microbiology. A practical Approach. Series editors: Rickwood and B. D. Hames. Chapter 6: Metabolism. Pp. 345-361. Oxford University Press. USA.

Lorch HJ., Benckieser G. and Ottow JCG. (1995) Basic methods for counting microorganisms in soil and water. *In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* K. Alef and P. Nannipieri (Eds). Academia Press, pp.146-161.

Madigan, M. T., Martinko, L. M. and Parker, J. (1999) Ecología microbiana: Biología de los microorganismos. 8ª ed. Prentice Hall Iberia Madrid, España. pp 532-605.

Moritis, G. (1996) EOR Survey and Analysis. OGJ Special, Oil & Gas Journal. Special. Pp. 39-61.

Muñoz Colunga A., Roldán C. T., Castorena C. G. y Olguín L.P. (2007) Adopción, desarrollo y adaptación de tecnologías aplicadas a la recuperación de aceite pesado. Instituto Mexicano del Petróleo. Reporte Final. Pp. 180-192.

Nelms, R. and Burk, R. (2004) Evaluation of oil reservoir characteristics to asses North Dakota carbon dioxide miscible flooding potential. 12th Williston horizontal well and petroleum conference. 31(1):10-12. North Dakota, USA.

Ollivier, B., Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M., Patel, B. K. C., Prensier, G. and Garcia, J.-L. (1998) *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. Int J Syst Bacteriol 48, 821–828.

Paulo, P., Stams, A., Field, J., Dijkema, C., Van Lier J., and Lettinga G. (2003) Pathways of methanol conversion in a thermophilic anaerobic (55 °C) sludge consortium. Appl Microbiol Biotechnol 63:307–314.

Pines O., Bayer E.A. and Gutnick D.L. (1983) Localization of emulsan-like polymers associated with cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 154:893-905.

Priego, R., Lozada, J., Peña, C. y Galindo, E. (2001) Rendimiento y calidad del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* y su relación con la velocidad específica de crecimiento. Departamento de bioingeniería, Instituto de biotecnología UNAM. Cuernavaca, Morelos. 1(6):7-21.

Przybulewska, K. and Krompiewska, A. (2005) Influence of soil NaCl salinity on number of microorganisms. Journal of Elementology, 10(1): 113-119.

Quintero- Ramírez R. (1987) Ingeniería bioquímica teoría y aplicaciones. Ed Alhambra Mexicana, Capítulo 2: Crecimiento Microbiano. Pp. 330-334.

Raiders, R. A., Knapp, R. M., and M. J. McInerney. (1989) Microbial selective plugging and enhanced oil recovery. J. Ind. Microbiol. 4:215–230

Rapp P., Bock H., Urban E., Wagner F., Gebetsberger W. and Schulz W. (1977) Use of trehalose lipids in enhanced oil recovery. DESHEMA Monogr. Biotechnol. 81:177-185.

Reynolds, P.J., Sharman, P., Jenneman, G.E. and Mclerney, M.J. (1989) Mechanisms of microbial movement in subsurface materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (9): 2280-2286.

Rodríguez-Valera, F. (1988) Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In *Halophile bacteria*, Volume I. Pp. 1-29. CRC Press, Boca Raton, FL.

Roggland M. and Dubnau D. (1993) "CornA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J. Bacteriol.* 175:3182-3187.

Ronald, A. (1995) Handbook of media for environmental microbiology. Pp. 101-150. CRC Press. USA.

Ronald, A. (1996) Principles of Microbiology. Pp. 1298. 2nd Edition. Mosby Press. USA.

Sánchez, J.L., Camacho, R., Flores, J. y Meza, E. (2008) Experiencia de PEMEX en reinyección de CO₂. PEMEX, exploración y producción. Informe Final. Pp. 1-8.

Sayyoub, M.H., Al-Blehed, M.S. and Hemeida, A.M. (1992) Possible Applications of MEOR to the Arab oil fields. Department of Petroleum Engineering, King Saud University. 5(2): 291-302. Saudi Arabia.

Sayyoub, M.H., (2002) Microbial Enhanced Oil Recovery: Research Studies in the Arabic Area during the last ten years. Oil Recovery Symposium. Vol. 1. Pp. 13-17. Tulsa, Oklahoma.

Secretaría de Energía. (SENER) (2003) Prospectiva del Mercado de petróleo crudo.

Stainer, R.Y. (1986) Microbiología. Ed. Repla. 4^a edición. México.

Sumnanen P, Bavon E Jo, Citron DM, Strong C, Wexler. HM. and Finegold SM. (1993) *Wadsworth Anaerobic Bacteriology. Manual* 5th ed. California: Star; 230 p.

- Takai, K. and Horikoshi, K. (2000) *Thermosipho japonicus* sp. Nov., an extremely thermophilic bacterium Isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* 4:9–17.
- Torbati, H.M., Raiders, R.A., Donaldson, E.C., McInerney, M.J., Jenneman, G.E., and Knapp, R.M. (1986). Effect of microbial growth on pore entrance size distribution in sandstone cores. *J. Ind. Microbiol.*, 1, pp. 227-254.
- Van Hamme, J., Sing, A. and Ward O. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67:503-549.
- Ventosa, A. and Nieto J.J. (1998) Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 85-94.
- Wagner, A., Lungerhausen, D., Nowak, U. and Ziran, B. (1993) Microbially improved oil recovery from carbonate reservoirs. 1(1): 695-709. Department of Microbiology. Germany.
- Whitman, W. Bowen, T and Boone D. (1992) The mathanogenic bacteria. *The Prokaryotes* Vol 1 (Eds) Balows A. Truper H. Dworkin M. Harder, W y Schleifer, K. Ed. Springer-Verlag. Pp. 123-128. USA.
- Wood, A. P. and Kelly, D. P. (1991) Isolation and characterization of *Thiobacillus halophilus* sp. nov., a sulfur-oxidising autotrophic eubacterium from a Western Australian hypersaline lake. *Arch Microbiol* **156**, 277–280.
- Yakimov M. M., Timmis K. N., Wray V., and Fredrickson H. L. (1997) Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5): 1706–1713.
- Yamaguchi, M. and Minami K. (1998) Production of Acetic Acid from Methanol by Thermophilic *acetanosarcina* sp.: Acetate Production as an Index in Abnormal Methane Fermentation . *Journal of Fermentation and bioengineering.* 86: 239-242.

Zeikus JG. and Wolfe RS. (1972) *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. N., and anaerobic autrophic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, **109** (2): 707-713.

ZoBell, C. E. (1947) "Bacterial release of oil from oil bearing materials". *World Oil Journal* 126 (1):36.

Consultas En Línea:

Berea SandstoneTM [en línea]: Petroleum Cores. www.bereasandstonecores.com [consulta Mayo, 2009]

Cámara Boliviana de hidrocarburos [en línea]: www.cbh.org.bo [consulta Febrero, 2008]

ANEXOS

ANEXO 1

Soluciones estándar.

Se requirieron preparar las siguientes soluciones para mantener y complementar tanto las condiciones como los medios de cultivo:

***Sulfuro de sodio 2%:** Agregar 2 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a un frasco serológico de 125 mL, añadir bajo flujo de N_2 , 100 mL de agua reducida. Tapar, sellar el frasco y esterilizar en autoclave por 15 min. a 121°C y 15 lb/pulg². Hacer cambio de atmósfera con N_2/CO_2 (v/v). Esta solución actúa como un elemento reductor.

***Bicarbonato de Sodio al 10%:** Agregar 10 g de NaHCO_3 a un frasco serológico de 125 mL, adicionar bajo flujo de N_2 , 100 mL de agua reducida tapar y sellar el frasco y esterilizar en autoclave por 15 min. a 121°C y 15 lb/pulg². Hacer cambio de atmósfera con N_2/CO_2 . Esta solución actúa como amortiguador.

***Hidrocarburo:** El hidrocarburo constituye la fuente de carbono y como tal es preferible utilizar un aceite ligero, colocar en un frasco serológico, tapar, sellar el frasco y esterilizar en autoclave por 15 min. a 121°C 15 lb/pulg² Hacer cambio de atmósfera con N_2/CO_2 .

ANEXO 2

***Solución de Oligoelementos de Balch** (*Balch et al., 1977*). Esta solución se prepara a partir de 4 soluciones:

- i) Solución de ácido nitrilotriacético: disolver 1.5 g de ácido nitrilotriacético en 100 mL de agua destilada contenida en un vaso de precipitados de 250 mL. Ajustar el pH de esta solución a un valor de 6.5 con KOH 10N (hasta que se ajusta el pH es cuando el ácido se disolverá completamente).
- ii) Solución de cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Disolver 0.1 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua destilada en un frasco de 100 mL.
- iii) Solución de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Disolver 0.1 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua destilada en un frasco de 100 mL.
- iv) Solución base de oligoelementos: Disolver las cantidades de los reactivos que se enlistan en la tabla A1.1 en un frasco de 250 mL adicionando 100 mL de agua destilada.
- v) Una vez que se tienen las 4 soluciones, mezclar la solución de oligoelementos, la de cloruro ferroso y la de cloruro de cobalto. Posteriormente adicionar lentamente a esta mezcla la solución de ácido nitrilotriacético y ajustar el volumen a 1 litro en un matraz volumétrico. Mantener esta solución en refrigeración.

Tabla A1.1. Compuestos para preparar la solución base de oligoelementos

Compuesto	Fórmula	Concentración (g/L)
Cloruro de magnesio hexahidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.6
Cloruro de sodio	NaCl	1.0
Cloruro Ferroso tetrahidratado	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
Cloruro de aluminio	AlCl_3	0.01
Acido bórico	H_3BO_3	0.01
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
Cloruro cúprico dihidratado	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
Cloruro de zinc	ZnCl_2	0.1

ANEXO 3

***Solución de vitaminas de Balch** (*Balch et al., 1977*): Esta solución contiene lo listado en la Tabla 6.1 y se prepara como se describe a continuación:

- i) Utilizar agua destilada reducida, para lo cual se añaden 1.2 L de agua a un matraz de 2 L, tapar con papel aluminio y sobre éste, hacer dos orificios, poner a calentar hasta ebullición para eliminar todo el oxígeno contenido en el agua, hasta llegar aproximadamente a 1 L. Dejar enfriar el agua sin destapar.
- ii) Pesar cada una de las vitaminas indicadas en la tabla A1.2 y disolverlas en 1L de agua reducida. Adicionar cada vitamina en el orden indicado hasta su completa disolución. La solución de vitaminas se debe esterilizar por filtración en un sistema Millipore con vacío, el cual debe ser previamente esterilizado (tanto el matraz Kitazato, sistema de soporte de membrana, receptor de líquido y membrana de filtración). Acoplar vacío al sistema de filtración y adicionar la solución de vitaminas. La esterilización por filtración se realiza en campana de flujo laminar para mantener condiciones estériles.
- iii) Colocar la solución filtrada en un frasco ámbar y almacenar en refrigeración a 4°C.

Tabla A1.2. Reactivos y cantidades para preparar la solución de vitaminas de Balch

Compuesto	Cantidad (mg L ⁻¹)
Acido p-aminobenzoico	10
Acido nicotínico	10
Pantotenato de calcio	10
Piridoxina hidroclicorada	10
Riboflavina	10
Hidroclicloruro de tiamina	10
Biotina	5
Acido fólico	5
Acido α.lipoico	5
Vitamina B12 (cianocobalamina)	5

ANEXO 4

Tabla A1.3. Composición de una cápsula de vitaminas biometrix

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
Palmitato de vitamina A	4000 UI
Colecalciferol (vitamina D ₃)	400 UI
Acetato, D, L, alfa tocoferol (vitamina E)	30 UI
Mononitrato de tiamina (vitamina B ₁)	2 mg
Riboflavina (vitamina B ₂)	2 mg
Clorhidrato de piridoxina (vitamina B ₆)	2 mg
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂)	0.006 mg
Biotina	0.03 mg
Niacinamida	15 mg
Acido fólico	0.8 mg
Acido ascórbico (vitamina C)	60 mg
Pantotenato de calcio	10 mg
Fosfato ácido de calcio	170 mg
Sulfato ferroso	30 mg
Fluoruro de calcio	0.411 mg
Oxido de magnesio	16.5 mg
Sulfato de cobre	4 mg
Sulfato de manganeso	3.7 mg
Sulfato de potasio	17.8 mg
Molibdato de sodio	0.40 mg
Oxido de zinc	9.3 mg
Levadura de selenio	7.5 mg
Extracto de panax Ginseng	30 mg
Extracto de Ginkgo biloba	10 mg
Excipiente cbp	

