

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

MEJORAMIENTO DE LOS CRUDOS PESADOS CON ACTIVIDAD BACTERIOLOGICA

Trabajo presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por:
Br. Spartacus Muñoz Cardenas
para optar por el titulo de
Ingeniero de Petróleo

Caracas, Julio de 2004

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**MEJORAMIENTO DE LOS CRUDOS PESADOS CON ACTIVIDAD
BACTERIOLOGICA**

Tutor Académico: Ing. Víctor Escalona
Tutor Industrial : Dr Vladimr Leon

Trabajo presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por:
Br. Spartacus Muñoz
para optar por el título de
Ingeniero de Petróleo

Caracas, Julio de 2004

Spartacus Muñoz Cárdenas

MEJORAMIENTO DE LOS CRUDOS PESADOS CON ACTIVIDAD BACTERIOLOGICA

Tutor académico. Ing. Víctor Escalona, **Tutor industrial:** Dr. Vladimir León
Tesis, Caracas, U.C.V, Facultad de Ingeniería, Escuela de Petróleo
Año 2004, 111 páginas.

Palabras claves: Biotecnología, mejoramiento de los crudos pesados, enzimas, bacterias.

Tomando en cuenta que las reservas de crudo pesado de Venezuela son las más grandes del mundo 270.000 MM de bbl, y que cada vez se avanza mas en el desarrollo de los crudos pesados, siendo hoy en día un negocio productivo para el país. Con el presente trabajo se busca dar un paso en el desarrollo tecnológico en el área de los crudos pesados, utilizando la biotecnología.

Es sabido que el negocio petrolero de los crudos pesados es un negocio integral entre el yacimiento y el mejoramiento de los mismos en la refinería, ya que las altas cantidades de azufre presente en el crudo, las altas producciones de coque, y el difícil transporte de estos a través de las tuberías, representan retos tecnológicos por resolver. Un paso en la respuesta de estos problemas es el uso de la biotecnología, que emplea los organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre, en este caso desulfurización y reducción de densidad del crudo pesado.

Una aplicación de la biotecnología en el área de los crudos pesados en Venezuela fue llevada a cabo en 1997 en el campo de Lagunillas, empleando la biotecnología como recuperación terciaria, y se obtuvieron un aumento en la tasa de producción de los pozos.

Se plantea en este estudio el mejoramiento de los crudos pesados con un grupo seleccionado de bacterias, procedentes del fondo marino de Mochima, del lago de asfalto de Guanaco (Edo Sucre), y del suelo de Sartenja (Edo Miranda).

Con las bacterias a través de su actividad enzimática se logro cambiar la densidad del crudo pesado Cerro Negro en al menos 2 API, y se demostró la capacidad de ciertos microorganismos de desulfurizar el DBT, molécula modelo de los compuestos aromáticos presentes en el crudo.

INDICE

INTRODUCCION	9
CAPÍTULO I. OBJETIVOS	
1.1 Objetivos generales	11
1.2 Objetivos específicos	11
1.3 Hipótesis	11
CAPÍTULO II. LOS CRUDOS PESADOS EN VENEZUELA	
2.1 Las reservas de crudo pesado	12
2.2 El negocio de los crudos pesado en Venezuela, tecnologías de producción y refinación, y sus debilidades.	13
2.2.1 Producción de los crudos pesados	13
La Producción De La Faja Petrolífera Del Orinoco	14
2.2.2 Mejoramiento de los crudos pesados	17
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS PESADOS	
3.1 A nivel molecular	20
3.1.1. Modelo molecular de un crudo pesado	20
3.1.2. Asociaciones moleculares	22
3.1.3. Composición de los crudos pesados y residuos	23
3.2 Naturaleza de los crudos pesados	24
3.2.1 Las tres características mas importantes asociados con la producción transporte y mejoramiento de los crudos pesados (viscosidad, producción de residuo de vacío y calidad del residuo de vacío)	25
CAPÍTULO IV. TECNOLOGÍAS EXISTENTES PARA EL MANEJO Y MEJORAMIENTO DE LOS CRUDOS PESADOS Y SUS DERIVADOS.	
4.1. Delaying coke	27
4.2. Hidrotratamientos catalíticos (hidrodesulfurización, hidrodesmetalización, hidrodesnitrogenación e hidrogenación)	28
4.3 Orimulsión	30
4.4 Tecnologías en investigación e innovadoras	31
4.4.1 Desulfurización de combustible por zeolitas	31
4.4.2 Aquaconversión	32
CAPITULO V. PROPUESTA BIOTECNOLÓGICA PARA MEJORAR LOS CRUDOS PESADOS	
5.1 Que es la biotecnología	34
5.2 Trabajos precedentes de biotecnología aplicados al petróleo	34

Mejoramiento De Los Crudos Pesados Con Actividad Bacteriológica.

5.2.1 Recuperación mejorada de petróleo utilizando bacterias	34
5.2.2 Biodesulfurización	36
5.2.3 Conversión química de los crudos pesados	39
CAPITULO VI. LAS BACTERIAS	
6 .1 Efectos de la biodegradación del petróleo comúnmente conocidos	42
6.1.1Crecimiento bacteriano	43
6.1.2 Medios de cultivo	45
6.2 La forma en que las bacterias transforman los compuestos	45
6.2.1 Que son las enzimas	45
6.2.2 Definición, estructura de una enzima, actividad enzimática, producción de enzimas a gran escala, su utilización tecnológica	47
CAPÍTULO VII JUSTIFICACIÓN EXPERIMENTAL	50
CAPÍTULO VIII EXPERIMENTOS	
Experimentos	54
CAPÍTULO IX ANÁLISIS DE RESULTADOS	80
CONCLUSIONES	98
RECOMENDACIONES	100
BIBLIGRAFÍA	101
GLOSARIO	104
ANEXOS	106

INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	PÁGINA
1.	Comparación entre crudos del Furrial (H/HX) y Morichal	25
2.	Propiedades De Algunos Crudos En Venezuela	26
3.	Variación Del Contenido De Azufre	40
4.	Variación Del Contenido De Níquel y Vanadio	41
5.	Determinación De Las Fracciones (SARA) del crudo UTM851	41
6.	Determinación De Las Fracciones (SARA) del crudo OSC Y MWS	41
7.	Experimento de Desulfurización	84
8.	Experimento de Desulfurización del DBT	85
9.	Crecimiento De Bacterias En Moléculas Modelo	87
10.	Cambios Observados De Densidad Cuando Se Coloca El Crudo Tratado En Agua Destilada	91
11.	Resultados Obtenidos Mediante El Tratamiento Bacteriológico Medido En Grados API	92
12.	Medidas De Densidad De Los Crudas Tratados, Con Una Relación Agua/ Petróleo de 62/38	94
13.	Medidas De Densidad De Los Crudas Tratados, Con Una Relación Agua/ Petróleo de 50/50	94
14.	Medidas De Viscosidad	95
15.	Análisis Sara Del Petróleo Extraído De La Orimulsión	95
16.	Análisis Sara Del Petróleo Extraído De La Orimulsión	96

INDICE DE ILUSTRACIONES

Numero	TITULO	PÁGINA
1.	Faja Petrolífera Del Orinoco	12
2.	Las Regiones De Petróleo Pesado En Venezuela	14
3.	Modelo De Arreglo de Pozo Multilateral Usado Por Petrozuata	15
4.	Transporte y Mejoramiento De Los crudos Pesados	18
5.	Costo para mejorar un barril de petróleo a través de delayed coke	19
6.	Compuesto Aromático Benceno (tronco)	20
7.	Compuesto saturado Octano (ramitas)	21
8.	Heteroatomo De azufre En Un Compuesto Aromático DBT	21
9.	Estructura Representativa De Un Asfáltenos	24
10.	Estructura Representativa De Un Asfáltenosen 3D	24
11.	Proceso De Delayed Coking	27
12.	Hidrotratamiento Catalítico En Una Molécula	28
13.	Una Gota De Crudo con Surfactante y Agua	30
14.	Estructura De Una Zeolita ZM5-5	31
15.	Proceso De Aquaconversion	33
16.	Historia De Producción Del Pozo 5	35
17.	Historia De Producción Del Pozo 3	36
18.	Ruta 4s Para desulfurización	38
19.	Ruta van Afferden	38
20.	Ruta Kodama (1973)	38
21.	Otro Cometabolismo Para El DBT Sugerido Por KODAMA	39
22.	Compuestos Con Azufre Presentes En El Petróleo	39
23.	Escala De Wenger	43
24.	Actividad Enzimática En Un Sustrato.	46
25.	Estructura De Una Enzima (dioxigenasa)	47
26.	Compuesto aromático (naftaleno)	50
27.	Mineralización del Naftaleno	50
28.	Etapas De Los Experimentos	79
29.	Crecimiento Bacteriano En Una Cápsula De Petri	81
30.	Experimento De Desulfurización	85
31.	Muestras De Crudo Tratado Con Extracto Celular	89

Mejoramiento De Los Crudos Pesados Con Actividad Bacteriológica.

32.	Muestras De Crudo Tratado Con Extracto Celular de bacterias Rizofera P1	89
33.	Medio Después Del Tratamiento Bacteriológico	90
34.	Muestra De Crudo En Agua Destilada Después De Separar Las Fases	90
35.	Porcentaje De Crudo Flotando En Agua Destilada	91
36.	Muestra Tratada Y Muestra Control	92
37.	Grados API Para Cada Una De Las Muestras	93
38.	Muestras de crudo tratado por bacterias en agua destilada	93
39.	Del Porcentaje De Asfáltenos Del Crudo Tratado con BM2 Y Sin Tratar	96
40.	Del Porcentaje De Asfáltenos Del Crudo Tratado con 5 ^a 1 Y Sin Tratar	97
41.	Proceso De BIODESULFURIZACIÓN	106
42.	Células Transformando Una Molécula	107
43.	Estructuras Aromáticas Presentes En El Crudo	108
44.	Rhodococcus Erythropolis IGTS8	109

INTRODUCCIÓN

Las reservas de crudo pesado son de igual magnitud que las de crudo liviano y mediano, sin embargo, lo que aporta a la energía que suple al mundo es menos del 5%. Venezuela posee alrededor del 78% del total de las reservas de crudo pesado y extra pesado del mundo, y solamente el 22% de la producción del país es de crudo pesado.

Las reservas recuperables de petróleo de crudo pesado y extra pesado en Venezuela son las mas grandes del mundo, cuenta con 270 mil millones de barriles, la faja petrolífera del Orinoco tiene una anchura de 800 km. de este a oeste y 200 km. de norte a sur.

En el pasado los crudos livianos y mediano habían tenido ventaja sobre los crudos pesados por su disponibilidad, su barata producción y procesamiento, sin embargo esta situación podría cambiar, con las tecnologías actuales y venideras de producción y mejoramiento de los crudos pesados. En el área de producción se utilizan nuevas tecnologías tales como, los pozos horizontales, desviados, multilaterales, inyección de vapor y otras, que han tenido buenos resultados. En el área de mejoramiento, se utiliza la aqua conversión, delayed coking, HDH, HDH plus, tradicional Visbreaking, hidrotreatamientos e hidrocrakeos y otras. Estas tecnologías tienen sus limitaciones tanto económicas como de rendimiento, por lo tanto, es necesario invertir dinero en el desarrollo e investigación de nuevas tecnologías, que contribuyan con el desarrollo de la producción, y mejoramiento de los crudos pesados, o que puedan ser mas eficientes y económicas de las ya existentes.

Hoy en día existen diferentes procesos que han sido patentados, en el caso de la desulfurización de los compuestos derivados del petróleo, como por ejemplo la hidrodeshulfurización que es llevada a cabo a altas temperaturas y altas presiones, o la desulfurización en zeolitas, e incluso desulfurización con bacterias. Sin embargo estos procesos presentan sus limitaciones, debido a los altos costos, a los bajos niveles de azufre que son capaces de manejar y al tiempo de transformación. Es necesario encontrar un procedimiento económico y que logre una desulfurización profunda. Ya que en el ámbito mundial las regulaciones ambientales se vuelven mas estrictas con respecto a los niveles de azufre permitidos en los combustibles.

Otra dificultad asociada a los crudos pesados es su difícil transporte y manejo de residuos del crudo en la refinería, debido a su alta densidad, viscosidad y contenido de asfalto. El problema del transporte del petróleo pesado es manejado empleando grandes cantidades de diluyente. A través del desarrollo de la biotecnología,

Mejoramiento De Los Crudos Pesados Con Actividad Bacteriológica.

en el presente trabajo, se pretende lograr paso hacia dos puntos importantes la bidesulfurización profunda y una bioconversión en los crudos pesados para mejorar su densidad, viscosidad, disminuir el contenido de asfalteno y de azufre, para que la biotecnología sirva en un futuro como herramienta en la producción y procesamiento económico de los crudos pesados.

A medida que ha sido posible transformar genéticamente a los seres vivos y hacer intercambio de material genético entre especies, se han generado nuevos procesos, entre ellos la aplicación de biotecnología a la industria petrolera.

El crecimiento del campo de la biotecnología, en la década de los 70, está íntimamente vinculado con el desarrollo de la ingeniería genética. Uno de los usos de la biotecnología es la ingeniería de petróleo para producción de bacterias, con el fin de biodegradar el crudo pesado, para el manejo de los derrames de petróleo y para tratamiento de rios de perforación.

Hoy se reconoce la necesidad de introducir tecnologías de limpieza en el procesamiento del petróleo, reducir el consumo energético y disminuir la contaminación. Por ello, la biotecnología ha empezado a ser utilizada en proyectos de investigación que permitan el bioprocesamiento del petróleo disminuyendo la contaminación; por ejemplo, la remoción biológica de azufre por bacterias; la remoción de metales por enzimas y la transformación de asfaltenos en componentes más ligeros por acción biológica. Se logra un doble propósito: el producto tiene mayor valor agregado y el bioproceso es más limpio y barato.

También se ha empezado a utilizar la biorremoción de compuestos orgánicos tóxicos, por medio de bacterias presentes en un filtro cuya actividad metabólica transforma y/o elimina estos compuestos. La biorremediación de suelos contaminados con petróleo es desarrollada para limpiar y/o disminuir el contenido de hidrocarburos de diferentes niveles de toxicidad presentes, en los suelos, a niveles permisibles después de ocurrido un derrame. También se han desarrollado trabajos de recuperación secundaria en pozos empleando bacterias, lo cual ha venido dando buenos resultados.

Por lo antes mencionado, la presente investigación plantea estudiar la actividad bacteriológica de una serie de microorganismos sobre el crudo pesado Cerro Negro, con la intención de mejorar sus propiedades físico-químicas. Y de esta forma contribuir al desarrollo o mejoramiento de las tecnologías existentes en Venezuela, para producir y mejorar los crudos pesados

CAPITULO I: OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVOS:

1.1. Objetivos Generales:

- Demostrar el mejoramiento de los crudos pesados a través de actividad bacteriológica

1.2. Objetivos Específicos:

- Aplicar tratamiento bacteriológico utilizando enzimas, extractos celulares y las células en crudos pesados y en emulsiones agua petróleo. Con microorganismos aislados en el laboratorio del IDEA, a los cuales se le ha demostrado que son capaces de crecer tanto en crudos pesados como en moléculas modelos de estos por ejemplo fenantreno, naftaleno, heptano y dibenzotiofeno como únicas fuente de carbono y en algunos casos de azufre.
- Medir las propiedades físico y químicas de los crudos pesados tales como densidad , viscosidad, °API, y análisis SARA antes y después del tratamiento bacteriológico.
- Establecer comparaciones entre ventajas y desventajas desde el punto de vista tecnológico de este proceso de mejoramiento bacteriológico y otros procesos de mejoramiento de los crudos aquaconversion , HDS, HDM, zeolitas, delay, coke y otros.

1.3. **Hipótesis:** Es posible mejorar las propiedades físico químicas de los crudos pesados con los microorganismos aislados en el laboratorio del IDEA

CAPITULO II

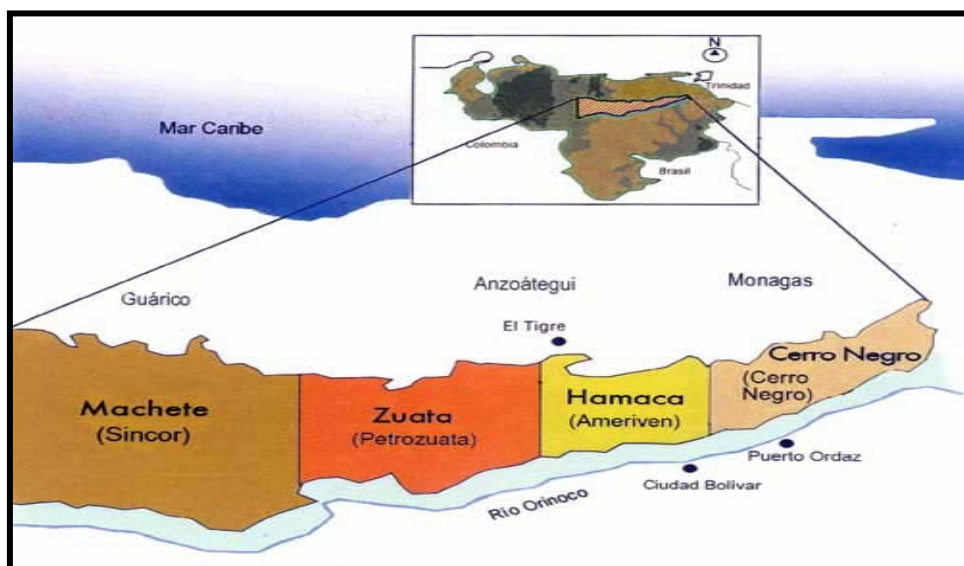
LOS CRUDOS PESADOS EN VENEZUELA

2.1. Magnitud de las reservas de crudo pesado

Las reservas más grandes de petróleo del mundo están dominadas por petróleo pesado y extrapesado, dentro de grandes arenas sedimentarias ubicadas en reservorios superficiales en el Norte y Sur de América y en otras partes¹.

El petróleo se clasifica por su valor económico de acuerdo a su gravedad API, la cual es una medida de la gravedad específica del petróleo desgasificado². Petróleos con una gravedad API de 20 o menos se clasifican como pesados, y los extrapesados de 10 o menos, un petróleo típico liviano marino no biodegradado tiene una gravedad API entre 36-38. Los Tar sands son arenas saturadas con petróleo extrapesado y pesado. El petróleo pesado y extrapesado en Venezuela y Canadá tiene una gravedad API de entre 6-12, y representa las acumulaciones mas grandes de petróleo pesado del mundo. La faja petrolífera del Orinoco es la acumulación mas grande del mundo con 1200 MMM de barriles (ilustración 1), mientras en la región de Atabasca en Canadá es la segunda con 900 MMM barriles^{3,4}. Estas acumulaciones empequeñecen a los campos de petróleo liviano mas grandes del mundo tales como Ghawar(Arabia Saudita) y Burghan (Kuwait), los cuales contiene aproximadamente 190 MMM cada uno³. Este crudo se originó en el periodo temprano del Cretaceo terciario, y se cree que es de origen marino⁵.

ILUSTRACIÓN N° 1. Faja petrolífera del Orinoco



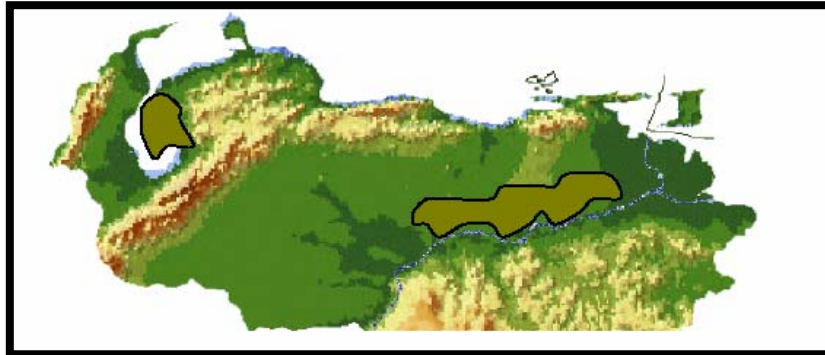
2.2 El negocio de los crudos pesados en Venezuela, tecnologías de producción, refinación y sus debilidades

Es sabido que las reservas más grandes del mundo son de crudo pesado y extrapesado. Esto fue confirmado recientemente en el año 2000 una vez más por USGS⁶. En la actualidad las refinerías usan crudo liviano como su principal fuente de alimentación, sin embargo hoy en día muchas refinerías están sustituyendo al crudo liviano por el pesado, basados en las oportunidades de la explotación de los crudos pesados. El petróleo pesado tiene un alto contenido de azufre lo cual es una fuerte desventaja con respecto al crudo liviano dulce, y requiere de procesos de mejoramiento que puedan manejar altos volúmenes de residuo de vacío. La diferencia en el precio, bajo condiciones de un mercado en equilibrio entre lo que cuesta el producto que sale de la refinería ya procesado y el costo marginal del mercado, es lo que da la ganancia del negocio. El petróleo pesado producido en Venezuela es procesado en refinerías que necesariamente tienen equipos para manejar altas cantidades de residuo de vacío o asfalto sólido, los cuales son un producto de la refinería⁸.

El riesgo común de la explotación de los crudos pesados integra al yacimiento con la refinería, bien sea el caso de que tenga que ser levemente mejorado o el caso en que el mercado exija una severa mejoría. Esta integración que presentan las actividades del negocio, es lo que hace presentar fallas a la hora de aplicar nuevas tecnologías en los correspondientes planes de negocio. El presente trabajo tiene el objetivo de brindar una nueva tecnología, que haga menos costosa la explotación de los crudos pesados⁸.

2.2.1. La producción de petróleo pesado en Venezuela

Las reservas de crudo pesado están localizadas en dos áreas, al Oeste en la base del lago de Maracaibo, y al Este al Norte de río Orinoco. Esta última es la llamada Faja Petrolífera del Orinoco que cuenta con 1200000 millones de barriles de petróleo original en sitio. En Venezuela existe una amplia variedad de yacimientos de petróleo pesado. Los reservorios de petróleo pesado en el Lago de Maracaibo son arenas poco consolidadas y bastante homogéneas. Los yacimientos de las Faja son más complejos, heterogéneos, delgados, arenas no consolidadas y además presentan variaciones entre ellos debido a la extensión de la Faja⁸.

ILUSTRACIÓN N° 2. Las Regiones de Petróleo pesado en Venezuela

Se han perforado y cementado pozos verticales desde que se descubrió el petróleo pesado en Venezuela. Pozos Verticales a hoyo abierto con liner ranurado y empaque de grava fue el diseño más utilizado en los 80. Los pozos verticales cementados tuvieron una producción promedio de 100-250 BPD, y los de diseño a hoyo abierto una producción promedio de 400-600 BPD. Los diseños de hoyo abierto se usan todavía en el Lago de Maracaibo, especialmente en áreas con buenas condiciones de presión⁸.

Pozos desviados de reentrada eran comúnmente perforados a partir de pozos verticales cementados ya existentes. Estos pozos de reentrada fueron colocados para drenar el petróleo remanente a través del arreglo vertical que ya existía. Alcanzando una tasa de producción promedio de 600-800 BPD⁸.

Pozos altamente desviados y pozos horizontales fueron perforados en Venezuela desde principios de los 90. Para el año 1997 más de 500 pozos horizontales habían sido completados en Venezuela y aproximadamente la tercera parte de estos, estaban localizados en los reservorios de crudo pesado, en el Este del Lago de Maracaibo y en La Faja. Los primeros pozos fueron construidos con un promedio de 1000 pies de hoyo abierto en la sección de producción usando liner ranurado. Este diseño todavía es usado en el Lago de Maracaibo.

Producción en la Faja petrolífera del Orinoco

El ambiente de deposición fluvial y deltaico el cual es bien conocido, en la actualidad, presenta arenas no consolidadas, gruesas y menos heterogéneas hacia el Este, delgadas y heterogéneas hacia el Oeste. Estas características han dado impulso a diferentes tecnologías en la construcción de pozos, tales como cambios en el diseño del pozo. Al igual que en Tía Juana han sido probadas muchas tecnologías tamaño escala en la Faja, como por ejemplo diferentes inyecciones de vapor para la

combustión en sitio. Avances recientes en la comprensión de las características del manejo del gas en solución del crudo presente en la Faja “ petróleo espumoso”⁷, sustenta la base de solo usar producción fría, dejando de lado los proyectos termales para un futuro solo si son necesario⁸.

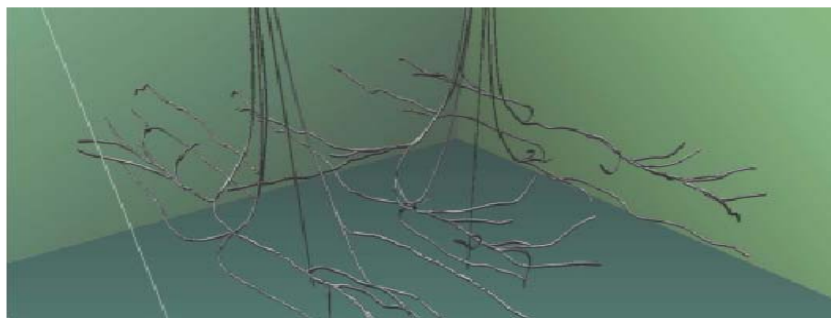
Avances en el modelaje y caracterización de yacimientos, han abierto el amplio uso de pozos horizontales. En general, la integración de la data sísmica 3D y 2D, datos dados por las herramientas en los pozos verticales, y los datos de los pozos estratigráficos, han permitido una mejor visualización del reservorio, lo cual permite diseñar el área de drenaje y posición del pozo horizontal, logrando un área de contacto óptima con las reservas del yacimiento⁸

Los pozos inclinados y principalmente horizontales fueron construidos en los 90 en diferentes unidades de operación, de la Faja incluyendo las asociaciones estratégicas.

Los pozos horizontales fueron diseñados originalmente para ser usados en 1000 pies de hoyo abierto en la zona productora usando liner ranurado para control de arena con una producción de 800-1200 BPD. Este mismo diseño es usado en pozos horizontales todavía, pero mas largos 2000 pies de hoyo abierto en la zona productora y se obtuvieron producciones de 1200-1600 BPD. Recientemente se llego al límite de la capacidad de las unidades de levantamiento artificial, tales como las bombas de cavidad progresiva. Avances en el diseño de bombas centrífugas electro sumergibles y bombas de cavidad progresiva trajo como resultado bombas con mucha más capacidad y abrió la puerta económica para pozos multilaterales⁸.

Una campaña de pozos multilaterales fue empezada por PDVSA con sus propias unidades de operación. El diseño multilateral consiste principalmente en 2 brazos con un patrón de ala de gaviotas, con un nivel de unión 4. Esta es una mejoría hecha sobre las construcciones previas de pozos multilaterales, debido a la alta calidad de la unión.

ILUSTRACIÓN N° 3. Modelo del arreglo de Pozos multilaterales usado por Petrozuata.



Para producir las reservas de la Faja se crearon cuatro asociaciones estratégicas con PDVSA, las cuales son: Cerro Negro, Ameriven, Petrozuata y Sincor. Las cuatro asumieron el riesgo del negocio integrado, producen el petróleo en los pozos ubicados en sus respectivas áreas y después lo mejoran usando delayed coking. El crudo sintético tiene dos destino para un leve mejoramiento en una refinería específica o un severo mejoramiento a través del hidrocracking del gas oil después de la primera conversión lo cual produce un sólido como residuo.

Desde del punto de arranque de la producción las asociaciones definen los lugares en los cuales los pozos productores son perforados. El tamaño de las zonas y el número de pozos productores varían de acuerdo a la asociación, sin embargo generalmente son iguales. Usualmente se realiza la perforación dentro del pozo, el cual es modulado, primero la superficie del hoyo, después la parte intermedia y por ultimo la zona productora. El arreglo y trayectoria de cada pozo es determinado, dentro de cierto predeterminado diseño, con la ayuda del modelo del yacimiento. Una de las prácticas más común es hacer por lo menos un pozo estratigráfico por cada arreglo de pozos, previa a la producción de los pozos productores. Optimización de la estratigrafía están reduciendo el tiempo de perforación y completación de los pozos, de un mes hasta 7 días. Esto ha reducido significativamente la inversión que se requiere por cada pozo⁸.

Cerro Negro, tiene arenas gruesas de entre 50 y 100 pies, y lugares donde se han colocado de 14 a 20 pozos horizontales por arreglo. Los pozos horizontales están teniendo en promedio una longitud de entre 3000 y 4000 pies de la zona productora, con una producción de 1600 BPD. Petrozuata empezó la producción de pozos horizontales en una zona más heterogénea y más delgada. Aumentando la longitud de la zona de producción de los pozos horizontales, para mejorar la eficiencia de producción de los pozos, los hoyos abiertos tienen una longitud promedio de la zona productora de 4000 pies y una producción de 1200 BPD (se nota una reducción comparado con Cerro Negro). Para mejorar la tasa de producción, tener un mejor acceso al petróleo original en sitio, y mejorar la eficiencia de recobro, Petrozuata decidió perforar pozos multilaterales. Los pozos multilaterales significan menos hoyos perforados, lo cual reduce el efecto sobre el ambiente y usualmente se minimizan los costos por barril. Con el tiempo se han alcanzado arreglos más interesantes de pozos para incrementar el área de contacto de petróleo. Los diseños patrones básicos empleados son: ala de gaviota, doble estaca, y pie de gallina. El diseño de espina de pescado fue probado, en esta área, pero no es extensamente usado. Los pozos

multilaterales hacen posible tener un promedio de producción de 3000 BPD, el cual es usualmente levantado con bomba de cavidad progresiva⁸.

Sincor es la asociación que se encuentra mas hacia el Oeste, tiene arenas muy heterogéneas y se han perforados arreglos con una buena estrategia de drenaje, con una mezcla de pozos horizontales e inclinados en patrón mariposa, usando un pozo estratigráfico en el centro de cada arreglo. Para mejorar las operaciones de perforación ellos han estado implementando un sistema de monitoreo de la perforación a tiempo real, el cual les permite hacer decisiones concertadas para mover la tierra del pozo, y ubicación de un mejor lugar de la red de producción⁸.

Todas las asociaciones estratégicas usan diluyente para reducir la viscosidad y poder transportar el petróleo producido. Durante la primera fase de la producción ellos envían un crudo sintético de aproximadamente 16-17 API. El uso y características de las bombas de cavidad progresiva han impuesto restricciones en la inyección hoyo abajo de diluyente, debido a posibles problemas con los materiales y fallas que pueda presentar la bomba. Si el material de la bombas es seleccionado apropiadamente, el diluyente puede ser inyectado hoyo abajo e incluso en pozos horizontales, (lo cual es una aplicación considerada por Sincor), para reducir todas las perdidas de presión desde el cabezal del pozo hasta las instalaciones de procesamiento.

Una vez que la producción se encuentra a cabeza de pozo, el líquido y el gas son recolectados en cada arreglo de pozos y manejado a través de bombas multifasicas, con el propósito de distribuir los fluidos hasta la estación de procesamiento central. El amplio uso de bombas multifase (con 2000 Hp) permite el desarrollo económico para el gasto de capital y instalaciones de procesamiento principal⁸.

Instalaciones convencionales de deshidratación e instalaciones de desalación son usadas antes que el crudo diluido sea bombeado a las instalaciones principales de procesamiento. En las instalaciones donde este crudo es mejorado, también el diluyente es recuperado y enviado de retorno para las áreas de producción.

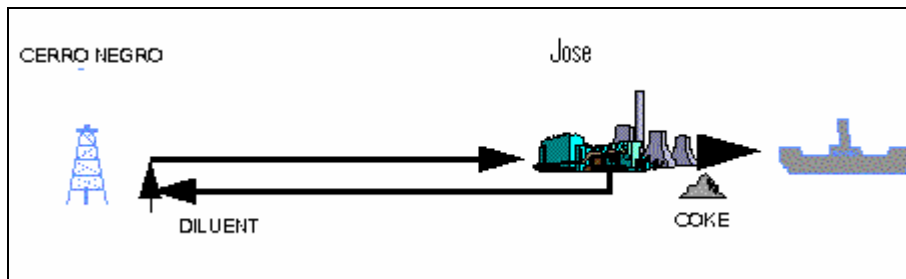
2.2.2. Mejoramiento del crudo pesado de la Faja Petrolífera de Orinoco

Para la incorporación del crudo de la faja al mercado, se requiere de otras actividades tecnológicas aparte de las ya mencionadas, es necesario convertir el crudo en uno más liviano, lo cual requiere operaciones dificultosas asociadas con la directa refinación de los crudos pesados, ya que es imposible manejar estos crudos en una refinería convencional.

Una de estas dificultades esta relacionada con la desproporción entre el destilado y la fracción residual. Otra esta relacionada con la adición de hidrogeno necesaria para que las fracciones entren en las especificaciones, y el daño que causan los contaminantes tales como azufre, metales y micro carbón en los catalizadores⁸.

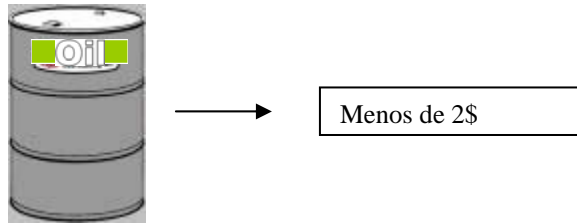
PDVSA en conjunto con las asociaciones estratégicas, cada una con diferentes patrones de explotación de la Faja, han acordado mejorar el crudo pesado en José el principal centro de mejoramiento del país, el cual se encuentra ubicado al lado este del país, allí el crudo diluido es separado y la fracción de mayor punto de fusión es convertida en crudo liviano a través de delayed coking. La mezcla de productos livianos craqueados con la fracción de livianos vírgenes menores, proveniente de los crudos pesados son hidrotratados hasta un nivel que se ajuste con las especificaciones de las asociaciones estratégicas. El amplio hidrotratamiento sobre las diferentes fracciones livianas y las cantidades de residuo pesado del crudo, en el crudo final sintético producido, dependen del destino del crudo que la asociación particular estableció como el mejor mercado para la refinación del mismo⁸

ILUSTRACIÓN N° 4. Transporte y mejoramiento de los crudos Pesados



Los costos de producción han sido reducidos hasta 1.75\$ por barril. El total de los costos de producción son aproximadamente repartidos, en gasto de capital y costos operativos. Los costos del proceso de delayed coking esta dominado por el costo del capital original de la inversión y están estrechamente relacionados con el nivel de mejoramiento de los crudos. Para un producto final típico de 21 API, el costo marginal para mejorar un barril de petróleo a través de delayed coking es menos de 2 \$. Teniendo esto en cuenta el proyecto de la Faja es ya atractivo, el cual requirió una inversión inicial de entre 9\$ MMM y 12 \$ MMM. Con una producción actual de 560000 BPD de crudo mejorado. Lo anterior convierte ya a la Faja petrolífera del Orinoco en un buen negocio para invertir⁸.

ILUSTRACIÓN N° 5. Costo para mejorar un barril Petróleo a través de delayin coke, para un producto de 21 API



CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN DE LOS CRUDOS PESADOS

3. Que son los crudos pesados

3.1. A nivel molecular

A pesar de ser el petróleo el material base de una industria que mueve millones de dólares anualmente, industria que durante más de 100 años ha procesado crudos y desarrollado numerosos derivados, el conocimiento molecular más bien es pobre, sobre todo en lo relativo a sus fracciones más pesadas. Puesto que los crudos pesados o los residuos de vacío constituyen una mezcla compleja, con interacciones físicas importantes que le confieren propiedades únicas, como las inmensas viscosidades a temperatura ambiente y el comportamiento viscoelástico de los asfaltos hasta los 60°C. A diferencia de los cortes livianos, donde es posible identificar cada una de las familias de moléculas presentes y predecir propiedades macroscópicas, considerando mezclas homogéneas; para los pasados no es posible hacer una descripción detallada, ni mucho menos la predicción de las propiedades, sin señalar las interacciones moleculares y las transiciones de fase esperadas⁹.

3.1.1 Modelo molecular de un crudo

Cada molécula de un crudo esta compuesta por dos unidades básicas: una parte aromática, común en todos los crudos, que en su unidad mínima corresponde a un anillo aromático (tronco) como lo muestra la ilustración N° 6, y una unidad constituida por saturados (parafinas y nafténicos) como lo muestra la ilustración N° 7, característica de cada crudo, o de cada corte de destilación, por ejemplo en su relación H/C (rama). La rama básica será una cadena alifática. Las moléculas del crudo corresponden a las combinaciones posibles de troncos y ramas, hasta un peso molecular de unos 1500 g/mol⁹.

ILUSTRACIÓN N° 6. Compuesto Aromático Benceno (tronco)

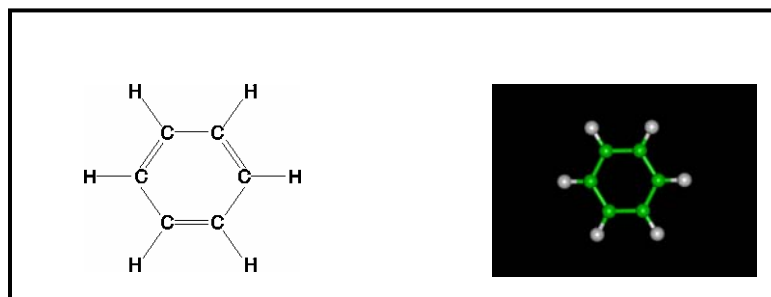
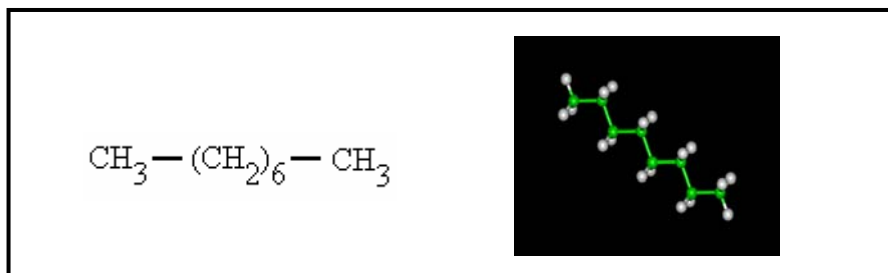


ILUSTRACIÓN N° 7. Compuesto Saturado Octano (Ramitas)

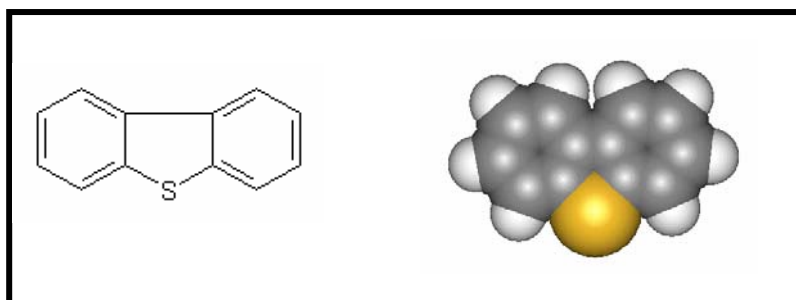


Wiehe¹⁰ sugiere el modelo “pendant core” para explicar la formación del coque. En este modelo el “core” siempre evoluciona a coque después de desprenderse, por rompimiento térmico de casi todos los “pendants”.

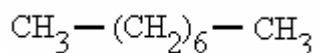
Muchas ramas con muy pocos troncos constituyen los saturados. A medida que aumenta el número de troncos por molécula, se van construyendo sucesivamente los aromáticos, las resinas y los asfaltenos. El coque corresponde a muchos troncos (o casi solamente troncos) y muy pocas ramas. La proporción de cada una de estas familias de moléculas constituye otra de las características específicas del crudo⁹.

Los heteroátomos (S, N, O), en proporciones características de cada crudo se encuentran mayoritariamente asociados a los troncos. El número de moléculas será proporcional al número de troncos, así los asfaltenos tienen el mayor número de heteroátomos, seguidos por las resinas. En los aromáticos hay pocos heteroátomos⁹.

ILUSTRACIÓN N° 8. Heteroatomo de Azufre en un compuesto Aromático DBT



Una descripción cuantitativa de la estructura molecular de un crudo, requiere la evaluación de las fracciones referidas anteriormente, tales como saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA)¹¹.



3.1.2. Asociaciones moleculares en un crudo

Las interacciones moleculares en un crudo pesado son energéticamente importantes, sobre todo entre las moléculas más complejas, las resinas o los asfaltenos por esta razón existe la probabilidad de formar dímeros, trímeros, etc. en el líquido. Para que esto ocurra es necesario un ajuste preciso entre las moléculas, que tienen una parte aromática plana con sustituciones nafténicas más o menos rígidas pero planas y sustituciones alquílicas de gran movilidad. El ajuste preciso permite maximizar el número de "contactos" (máximo acercamiento de las nubes electrónicas respectivas).

La interacción molecular es energéticamente importante por dos razones: al ser el número de átomos por molécula grande, existe la posibilidad de conseguir un ajuste con muchos contactos de máxima aproximación. Como las moléculas tienen núcleos aromáticos (regiones planas) la aproximación de estas regiones, cuando no lo impide la disposición de sustituciones alquílicas, maximizan rápidamente el número de contactos⁹.

La interacción dominante es el tipo Lifshitz-van der Waals¹², esta interacción se origina en las nubes electrónicas correspondientes, la parte principal se denomina dipolo inducido, son pequeñas deformaciones de la nube electrónica. Esta interacción es más importante para nubes electrónicas más extendidas (nubes de los anillos aromáticos, por ejemplo). También se incluyen las posibles interacciones dipolo-dipolo. Las interacciones ácido-base, que incluyen como caso especial los enlaces de hidrógeno, intervienen en menor grado¹². Estas interacciones determinan asociaciones moleculares y eventualmente transiciones de fase.

Las asociaciones moleculares típicas presentes en el crudo (a temperatura ambiente): unidades de forma esférica constituidas por tres o cuatro asfaltenos con dos o más resinas¹³, son el resultado de un compromiso energético entre las interacciones moleculares y la energía necesaria para tomar la conformación precisa que permita el encaje de moléculas. Estas asociaciones no son como las misceláneas que se forman cuando surfactantes se encuentren disueltos en agua en concentraciones por encima de la micelar crítica (cmc). En el caso del crudo existe una diversidad inmensa de moléculas, sin una unidad molecular repetitiva y cada molécula tiene muchas conformaciones, por lo que para lograr la asociación se requiere no solo de moléculas similares sino con ajuste espacial, no único, pero sí preciso. Esto

determina que la cinética de formación (o de ruptura) de los agregados moleculares característicos de un crudo sea muy diferente⁹.

3.1.3 Composición de crudos pesados y de residuos

Los residuos de la destilación del petróleo pueden ser líquidos o sólidos. Los residuos de la destilación al vacío son sólidos, de punto de fusión usualmente inferior a 180°C.

Las proporciones relativas de los distintos compuestos de azufre y en general, la composición química total, varían fuertemente de un tipo de crudo a otro. Así, por ejemplo, son conocidas las diferencias de aromaticidad que presentan los crudos.

Los crudos pesados y bitúmenes se pueden separar por extracción fraccionada, mediante parafinas lineales, en aceites viscosos llamados maltenos y un precipitado sólido, que recibe el nombre de asfáltenos.

Las fracciones más comunes en que se pueden dividir una carga mediante extracción con parafinas livianas son: asfáltenos, resinas y maltenos.

Los asfáltenos consisten en hidrocarburos de alto peso molecular, de un carácter predominante aromático, con un contenido de hidrógeno comparativamente bajo, formado por la condensación y deshidrogenación, a partir de hidrocarburos aromáticos-nafténicos de menor peso molecular. Como mezcla algo de oxígeno, azufre y nitrógeno están presentes¹⁴.

Dependiendo de la intensidad de tratamiento térmico al cual se somete el corte básico o el bitúmen que se forma a partir de él, se obtienen diferentes asfáltenos, que comprenden un rango continuo, con crecientes contenidos de carbono, "carbenos", "carboides" y por último coque.

Un punto importante es que la mayoría de los asfáltenos tienen una marcada tendencia a absorber hidrocarburos aromáticos en menor peso molecular y esta facultad es más pronunciada cuanto menos severo ha sido el tratamiento térmico¹⁴.

ILUSTRACIÓN N° 9. Estructura representativa de un asfaltenos

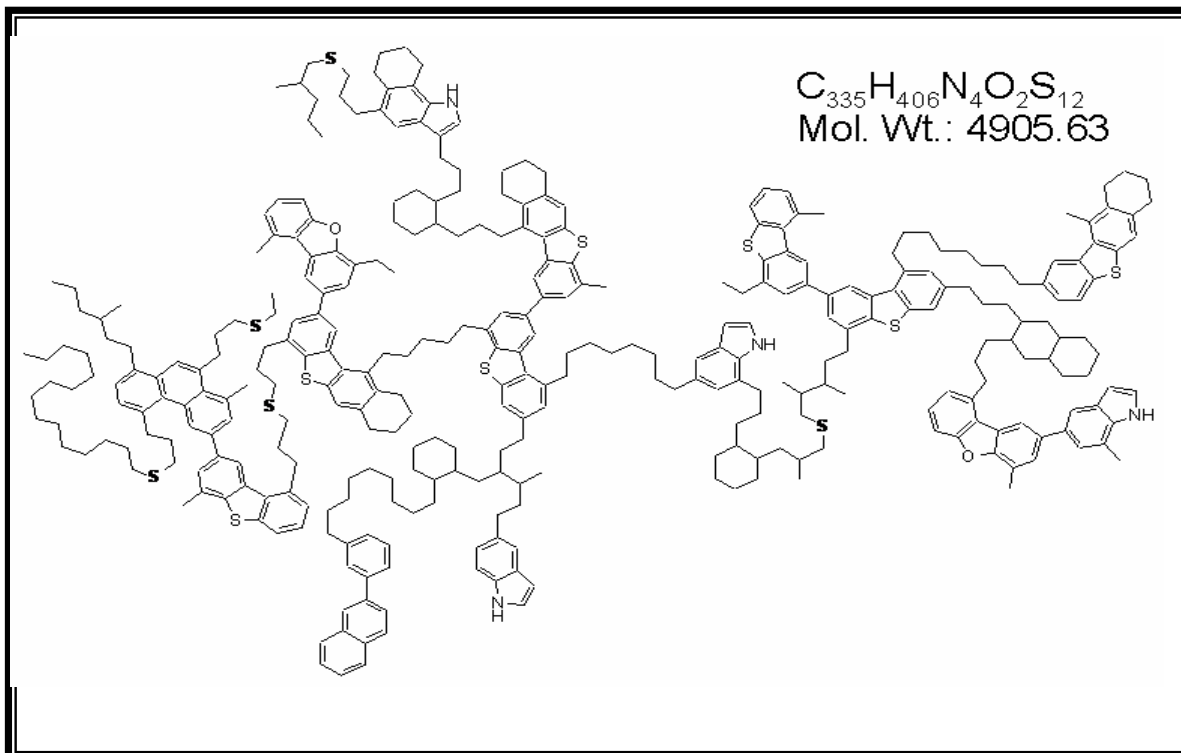
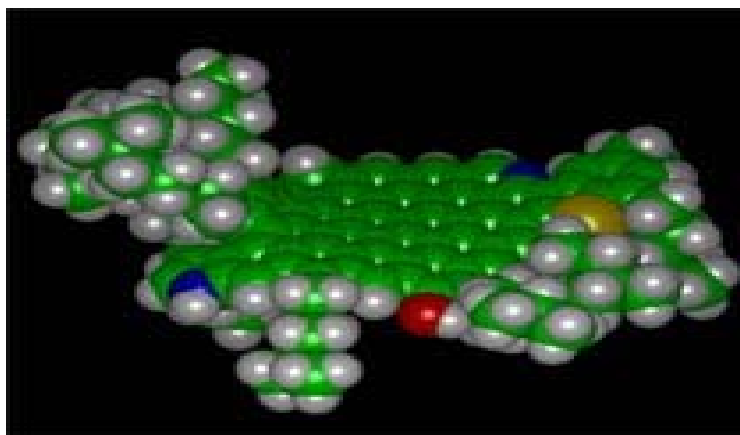


ILUSTRACIÓN N° 10. Estructura representativa de un asfaltenos (3D)



3.2 Naturaleza de los crudos Pesados

Las diferentes características entre los crudos pesados y livianos, hacen que se requiera de tecnologías diferentes para su producción, transporte y mejoramiento. Tal como lo muestra la siguiente tabla entre un crudo liviano del Furrial y un crudo pesado de Morichal, región que forma parte de la Faja petrolífera del Orinoco¹⁵.

TABLA N° 1. Comparación entre crudos del Furrial y Morichal (H/HX)

	Crudo liviano	Crudo Pesado
Propiedades	Furrial	Morichal
API gravity	22.9	8.5
Azufre, wt %	1.13	3.96
Nitrogeno	0.22	0.73
C7 Asfalténo	2.0	10.2
Conrad Carbon, wt %	4.76	15.8
Vanadio, ppm	49	488
Niquel, ppm	11	105
Viscosity, cst		
@50°C	7.4	14257
@60°C	5.9	5533
pour point °C	menor de -31	27
Tang(mgKOH)/g	9.36	2.27
Yields(vol%)		
350°C+	52	88
520°C+	21	56

3.2.1. Las tres características más importantes relacionadas con la producción, transporte y mejoramiento de los crudos pesados son:

Viscosidad: debido a su elevado valor de viscosidad tanto para los crudos pesados como los extrapesados, se ha implementado un método especial para tener una tasa económica de los pozos de la faja, el cual consiste en utilizar diluyente con un punto de ebullición en el rango de Kerosen-Naptha, inyectarlo y recuperarlo en un esquema de reciclaje. Si el lugar de mejoramiento del crudo se encuentra lejos del área de producción, entonces el mismo diluyente se emplea para transportar el crudo, y si las distancias son muy grandes esto aumenta la cantidad de diluyente necesario lo cual genera un incremento en los costos. En el caso particular de la Orimulsión el diluyente es usado solo para producción, y una formulación agua –Petróleo es usada para producir un combustible transportable¹⁵.

Producción de residuo de Vacío: la alta producción de residuo de vacío asociada a la producción de los crudos pesados y extrapesados, trae como consecuencia que la capacidad de conversión final de las plantas tiene que ser alta con respecto al volumen de materia prima de crudo. Esta conversión necesaria en los residuos de vacío, requiere una gran inversión, lo cual aumenta el precio de producción del barril de petróleo pesado comparado con los crudos livianos. Si el mejoramiento se hace en el país productor es necesario una alta inversión para la

refinería, y si se lleva a cabo en refinerías convencionales, lo más probable es que después se necesite alguna conversión adicional¹⁵.

Calidad del residuo de vacío: la calidad del residuo de vacío es un tema importante con respecto a la selección y eficiencia de la tecnología de conversión. El alto nivel de metales tales como vanadio y níquel, son características de los crudos pesados de Venezuela. Lo cual produce un efecto negativo en la HDM/HDS, a través del envenenamiento de los catalizadores¹⁵.

TABLA N° 2. Propiedades De Algunos Crudos En Venezuela

Propiedades de Algunos Crudos Pesados de Venezuela								
Crudo	H/C	°API	Viscosidad 80C(cst)	Carbo Conradson %	V(ppm)	S(ppm)	N(ppm)	Asfalteno (%)
Cerro Negro	1,14	8,1	5000	17,22	367,4	3,7	0,76	11,5
Morichal	1,2	9	5400	11,8	390	3,92	0,52	8,6
Bachaquero		12,4	280	8,8	470	2,94	0,38	8,8
Boscan		10,1	1832	15	1220	5,66	0,44	15,2
Tia Juana		11,1	925	12,3	397	2,53	0,3	7,5

En la presente tabla se observan características de los crudos pesados tales como su baja relación H/C, alta viscosidad, alto contenido carbono residual, y alto contenido de contaminantes (esencialmente S, N, Ni y V), gran cantidad de asfaltenos. Además de un bajo rendimiento en la producción de destilados¹⁶.

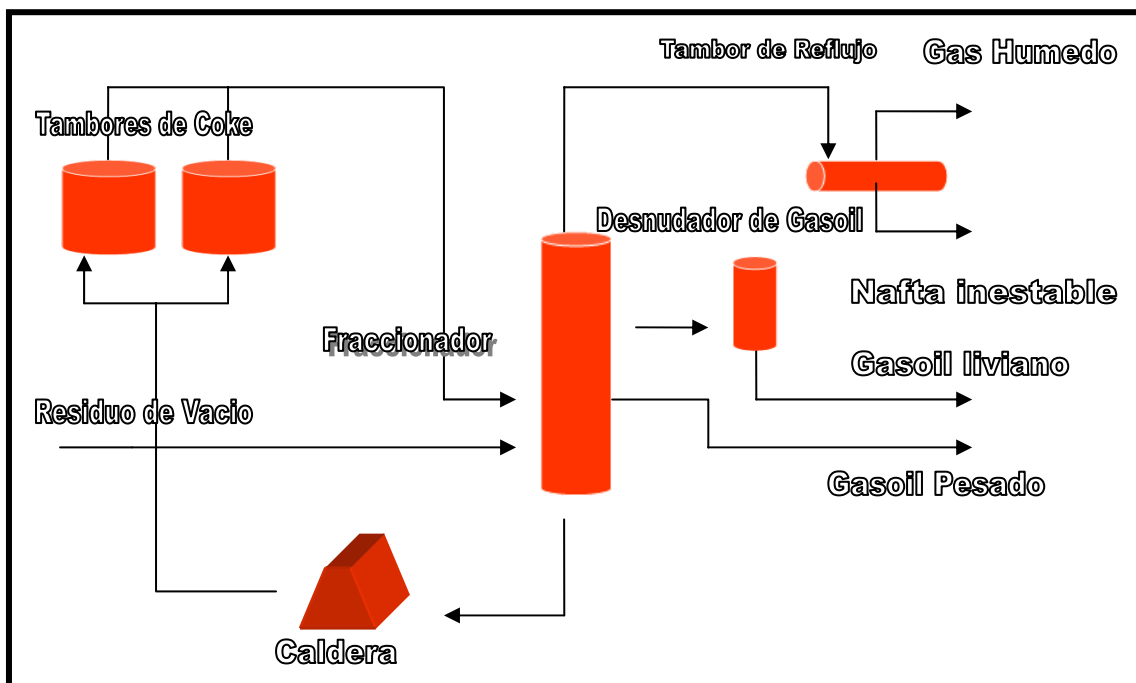
CAPITULO IV

TECNOLOGÍAS EXISTENTES EN EL ÁREA DE MEJORAMIENTO Y MANEJO DE LOS CRUDOS PESADOS Y SUS DERIVADOS:

4.1. DELAYED COKING

Se basa en el continuo refinamiento a lo largo de varias décadas, el diseño de Delayed Coking acumula una data de 60 años de instalaciones comerciales. El proceso tiene la capacidad de manejar una amplia variedad de alimentaciones, materiales crakedos, así como también líquidos derivados del carbón. Las unidades de diseño de Delayed coking tienen las siguientes características, control computarizado de las líneas, uno o dos quemadores calderas, modernos diseños de tambores mecánicos, manejo de agua y sistemas de recobro de coke¹⁷.

ILUSTRACIÓN N° 11. Proceso De Delayed Coking



El proceso delayed coking es un proceso de semi baño que usa tambores alternativos, uno se apaga después que se llena, entonces el otro se enciende.

El residuo de petróleo caliente alimenta el fraccionador donde se mezcla con un condensado recirculado.

El flujo combinado luego es calentado en un horno para iniciar la formación de coke, por la parte de arriba de los tambores el vapor fluye para el fraccionador donde este es separado en gas húmedo, nafta inestable, gasoil liviano, gasoil pesado y

parte de la mezcla es reciclada nuevamente. El vapor después entra en el sistema de enfriamiento y son recuperados el resto de los hidrocarburos¹⁷.

El coke es hidráulicamente cortado en los tambores y este se vierte en un hoyo donde el agua es separada del coke y reciclada nuevamente.

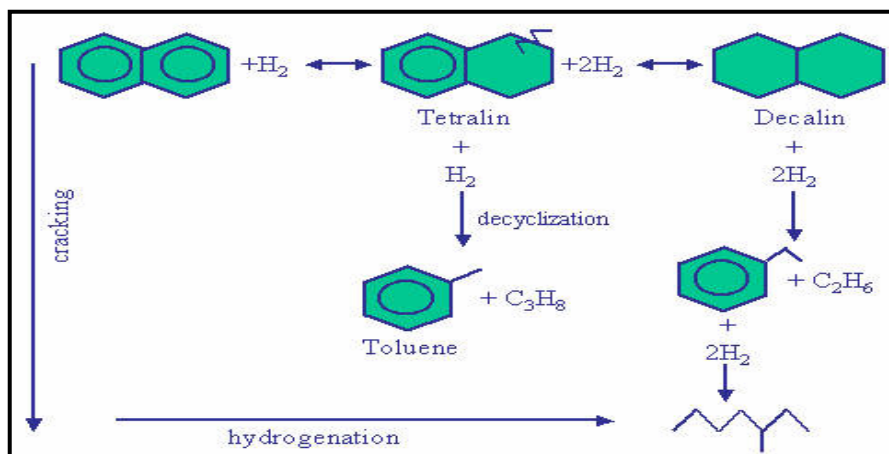
4.2. HIDROTRATAMIENTO CATALÍTICO:

Los crudos pesados y residuos atmosféricos o de vacío tienen muchas similitudes en su composición. Ellos generalmente poseen una muy baja relación H/C (1,4-1,6) con respecto a la que poseen los destilados medios y productos lubricantes(1,8-2,1) quienes tienen el mayor valor económico en el mercado. Por lo tanto una meta en la conversión de residuos y crudos pesados es aumentar la relación de H/C. Esta meta puede ser lograda por dos vías rechazo de un carbón o adición de hidrogeno (hidrotratamiento), esta ultima es la mas atractiva por la calidad de los productos que se obtienen¹⁶.

El hidrotratamiento se refiere a la variedad de procesos catalíticos de hidrogenación mediante los cuales se saturan los hidrocarburos insaturados y/o se remueve de los azufre, nitrógeno, oxígeno, y metales (principalmente Vanadio y Níquel) de las diferentes corriente de petróleo en una refinería. Estos procesos representan alguno de los procesos catalíticos más importantes.

EN el hidrotratamiento, por lo general ocurre un pequeño cambio en la estructura molecular del sustrato, sin embargo en las reacciones de hidrocrackeo que suelen ocurrir al mismo tiempo, las cuales son deseadas, en ellas ocurre un disminución notable en la distribución del tamaño molecular de la carga tratada. El hidrotratamiento tiene un papel importante en el pretratamiento de la alimentación de otros procesos de refinería¹⁶.

ILUSTRACIÓN N° 12. Hidrotratamiento Catalítico en una molécula.



Los principales propósitos del hidrotratamiento en la refinería son:

4.2.1. Hidrodesulfurización:

- Evita el envenenamiento de los catalizadores usados en procesos posteriores
- Cumplir con las regulaciones ambientales
- Reducir la corrosión durante la refinación
- Mejorar el olor de los productos

4.2.2. Hidrogenación:

- Hidrogenación de aromáticos para aumentar el número de cetanos
- Hidrogenación de aromáticos para cumplir con las regulaciones ambientales
- Mejorar el punto de humo
- Hidrogenación de oleofinas para mejorar la estabilidad del producto e evitar la formación de gomas.

4.2.3. Hidrodesnitrogenación :

- Evitar el envenenamiento de los sitios ácidos de los catalizadores
- Cumplir con las regulaciones ambientales (evitar la formación de los NOx)

4.2.4. Hidrodesmetalización:

- Evitar la disposición de metales (envenenamiento) sobre los sitios activos de los catalizadores usados en procesos posteriores.
- Evitar la destrucción de la estructura del soporte del catalizador.
- Cumplir con las regulaciones ambientales
- Tratar de aprovechar los metales como un producto adicional para su comercialización.

Una de las principales características de los procesos de hidrotratamiento es que ellos trabajan a altas presiones y altas temperaturas, lo cual requiere de instalaciones específicas de altos costos; Y por otro lado están controlados por efecto de difusión de masa y calor, lo cual disminuye la eficiencia del proceso¹⁶

Para remover el contenido de azufre presentes en el crudo, la refinería aplica procesos catalíticos que operan a altas temperaturas (300C a 340C) y altas presiones (20 a 100 atm de H₂) para usar los catalizadores Co-Mo/Al₂O₃ o el Ni-Mo/Al₂O₃. El proceso de hidrodesulfuración es altamente eficiente en la eliminación de thiols, sulfides, y disulfides, pero es poco eficiente en los aromáticos, tiofenos y derivados aromáticos. Así que los compuestos aromáticos permanecen en el

combustible de transporte en forma de tiofenos, benzenos y sus derivados alquílicos. Para lograr la reducción del contenido de azufre de acuerdo con las nuevas regulaciones ambientales es necesario que el tamaño del reactor se incrementado en un factor de 5 a 15 veces el tamaño, lo cual aumenta considerablemente los costos¹⁸.

4.3. Orimulsión

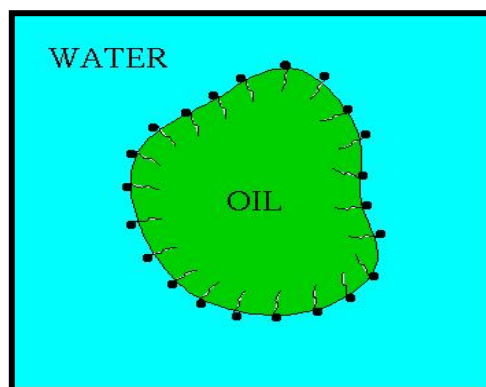
Es una emulsión de agua en petróleo que se utiliza para manejar los crudos pesados con mayor facilidad, ya que estos por su alta viscosidad y peso molecular, dificultad su producción, transporte y estudios que se le puedan realizar.

Una emulsión es una mezcla homogénea de líquidos que en condiciones normales son inmiscibles. En esta mezcla uno de los líquidos se encuentra disperso en el otro en pequeñas gotas cuyo diámetro puede ser de 2 a 6 micrones¹⁹.

Una emulsión es estable cuando sus componentes no se separan, sino mediante el empleo de algún procedimiento especial de tratamiento. Para esta condición de estabilidad son imprescindibles tres condiciones:

- A) los líquidos deben ser inmiscibles
- B) La dispersión de una fase en la otra debe ser ayudada por suficiente agitación.
- C) Presencia de una tercera sustancia que promueva la formación de la emulsión, que se denomina surfactante.

ILUSTRACIÓN N° 13. Una gota de crudo con surfactante y agua.



Existen en el petróleo surfactantes naturales, que se producen en el mismo en cantidades pequeñas (2 a 10 ppm). Estas bajo condiciones apropiadas son suficientes para promover emulsiones fuertes. Los surfactantes rodean a las gotas, formando una película monomolecular, que actúa como factor estabilizante¹⁹.

Los surfactantes más comunes en el petróleo son: Asfaltos, sustancias Resinosas, ácidos orgánicos solubles en el petróleo, óxido férrico, calcio y bario, sulfatos de aluminio, bario, carbonato de calcio, sílice y sulfuro de hierro, sólidos microscópicos oleofilicos. La estabilidad de una emulsión esta controlada por diversos factores tales como, surfactantes, viscosidad, densidad, porcentaje de agua, edad de la emulsión y oxígeno.

En el caso particular de la Orimulsión el diluyente es usado solo para producción, y una formulación agua–Petróleo es usada para producir un combustible transportable¹⁵.

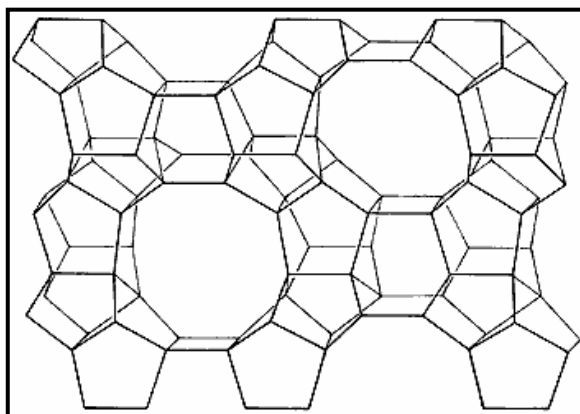
Esta emulsión es un combustible que puede ser utilizado, para generar energía eléctrica y compite con el carbón en eses mercado. Se han creado y probado dispositivos que se colocan en la salida de los gases de las plantas eléctricas cuando se quema este combustible, para disminuir los niveles de contaminación a rangos aceptables

4.4. Tecnologías innovadoras y por desarrollar en los crudos pesados

4.4.1. Desulfurización de los combustibles de transporte (gasolina, diesel y combustible jet) bajo condiciones ambiental es (Zeolitas).

Hoy se insiste con razón en que los términos zeolita y tamiz molecular no son realmente sinónimos. En realidad, para ser tamiz molecular no es necesario que el material sea un aluminosilicato cristalino con una red abierta que permita el intercambio de iones y una deshidratación reversible, como es el caso de la zeolita.

ILUSTRACIÓN N° 14. Estructura de una Zeolita (ZMS-5)



Un nuevo reto es usar la absorción para eliminar los componentes con azufre de los combustibles de transporte. Ya que la absorción puede ser llevada a cabo a condiciones de presión y temperatura ambientales lo cual la convierte en un proceso económico., el éxito en esta área podría estar dirigido hacia el mejoramiento en las refinerías y aplicaciones de combustible de células. Sin embargo todos los absorbentes comerciales disponibles hasta ahora estos han sido probados en la desulfurización y los resultados no han sido satisfactorios hasta ahora, por otro lado se reporto el caso de un absorbente que se encuentra en estudio el cual logro disminuir los niveles de azufre hasta 0.11 ppm en combustibles de transporte, valor que cumple con las regulaciones ambientales(500 a 15 ppm en los EEUU para el 2006) y las limitaciones del combustible de células(0.1 a 0.2 ppm).Esta tecnología es muy prometedora por ahora se encuentra en investigación¹⁸.

4.4.2. Aquaconversión:

Es una ampliación del tradicional Visbreaking. Al igual que el Visbreaking el residuo se crakea y es tratado térmicamente. Sin embargo no es igual que el craqueo tradicional en el cual la reacción de polimerización disminuye la producción de destilado y aumenta la cantidad de asfáltenos, el proceso de aquaconversión suprime la reacción de condensación a través de una suave hidrogenación de los radicales libres formados corrientemente en el craqueo térmico. Esta hidrogenación es alcanzada por un activador catalítico que transfiere los hidrógenos desde una pequeña cantidad agregada por la alimentación, la suave hidrogenación es alcanzada sin que precipiten los asfáltenos. El proceso de aquaconversión tiene aplicaciones tanto de refinería como en el cabezal de pozo²⁰.

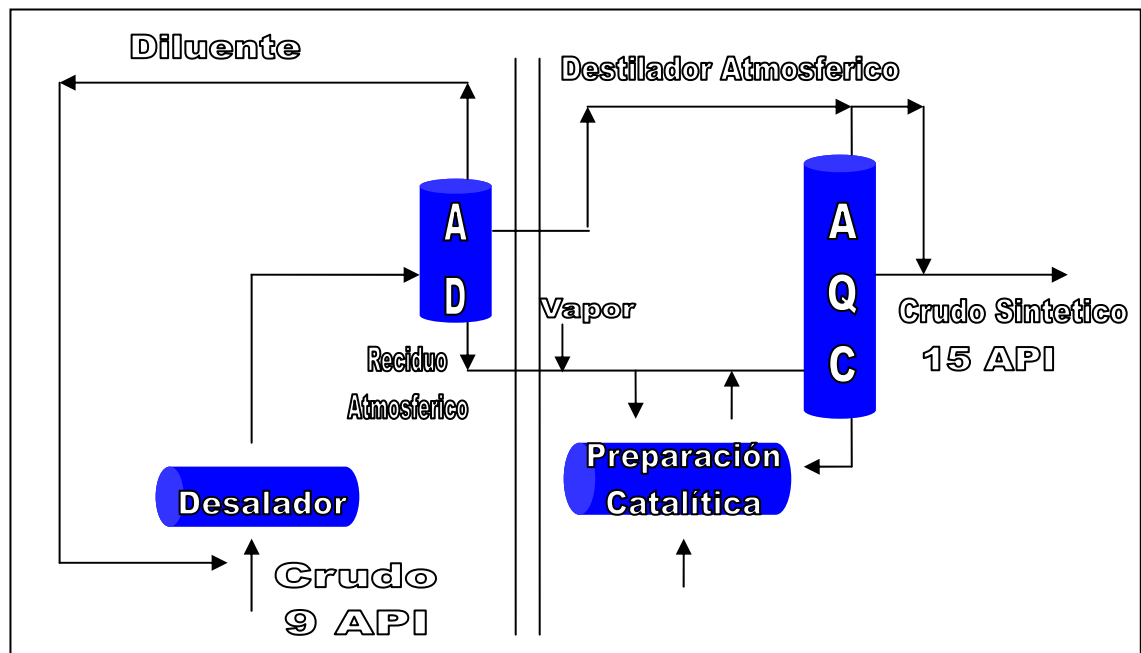
Aplicaciones de refinería

En la refinería, el proceso de aquaconversión puede reemplazar o modificar el tradicional Visbraking. El proceso de aquaconversión tiene la habilidad de reducir la viscosidad de los componentes pesados del pool de combustible de la refinería permitiendo a la refinería beneficiarse con un incremento de la producción de combustibles, con un mínimo incremento de la inversión. Adicionalmente este proceso permite sacar provecho de la producción adicional de destilado y productos livianos los cuales tienen un nivel de conversión significativamente más alto que el que se obtiene con la tecnología de Visbreaking¹⁵.

Aplicaciones en el cabezal de pozo

El proceso de aquaconversión puede mejorar el crudo extra pesado para producir crudo liviano sintético. Las grandes acumulaciones de crudo extra pesado en la faja petrolífera del Orinoco y otras áreas del mundo, son difíciles de transportarlas al mercado. Se logran mejoras en la economía con respecto a los procesos tradicionales de producción, transporte y mejoramiento de los crudos pesados, la cual es atribuida a un capital mas bajo de inversión y a la eliminación del capital de operaciones y costos asociados con las grandes cantidades de diluyente ²⁰.

ILUSTRACIÓN N° 15. Proceso de Aquaconversión



CAPITULO V

PROPUESTA BIOTECNOLÓGICA PARA MEJORAR LOS CRUDOS PESADOS

5.1. ¿Que es la biotecnología?

Es toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.

En términos generales biotecnología se puede definir como el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre.

La biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y molecular, las cuales pueden ser utilizadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales o animales. Otra forma de definirla es la aplicación comercial de organismos vivos o sus productos, la cual involucra la manipulación deliberada de sus moléculas de DNA. Por tanto, se puede decir que la biotecnología abarca desde la biotecnología tradicional, muy conocidas y establecidas, y por tanto utilizadas, como por ejemplo la fermentación de alimentos, hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del DNA recombinante (ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos.

5.2 Trabajos precedentes de biotecnología aplicada al petróleo

En la industria petrolera existen varias patentes biodesulfurización y se esta realizando investigación en diferentes áreas, en las cuales la biotecnología es aplicable, tales como mecanismos de biodegradación de los hidrocarburos en el caso de derrames, bioconversión de los crudos pesados para mejorar sus propiedades físico químicas, recuperación mejorada, biorremedación de los suelos y las aguas, tratamientos biológicos de efluentes hídricos, biodesulfurización, tratamientos biológicos de residuos oleosos, goma xanta, exploración geomicrobiológica del petróleo y biofiltración²¹

5.2.1 Recuperación mejorada por bacterias

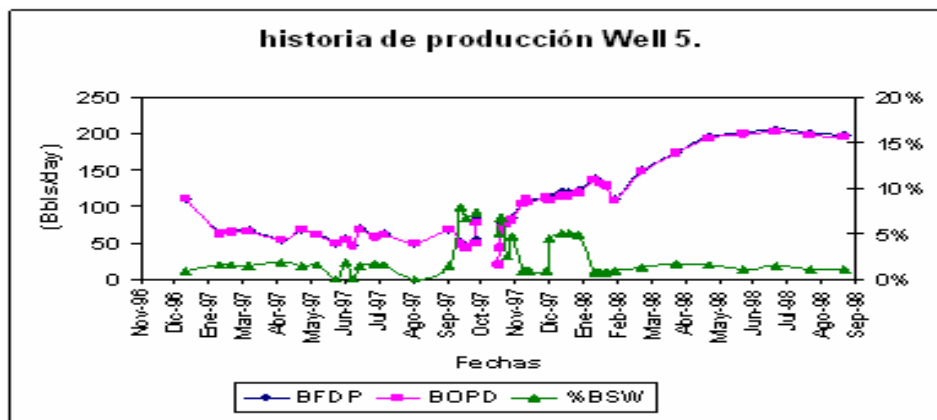
Una estimulación microbial fue llevada a cabo en 1997 por PDVSA Occidente en 33 pozos de 3 reservorios diferentes ubicados en Lagunillas, Venezuela,. Estos

yacimientos producen petróleo con una gravedad API en un rango de 10 a 19. Se evaluaron diferentes concentraciones de productos microbianos, con el propósito de reducir el tiempo de incubación (pozo cerrado) .Los pozos estimulados se encontraban en el lago, y fueron inyectados usando un equipo de barcaza de propulsión de si mismo, tanques mezcladores y bombas triples. La solución fue inyectada por la tubería hacia el yacimiento. Después de haber inyectado el pozo permaneció cerrado de 5 a 10 días, dependiendo de la concentración de bacteria, los resultados arrojaron un incremento de 50% a 200% en la producción .Lo cual indica que los microorganismos son una alternativa adicional al tratamiento convencional²².

Existen varios mecanismos a través de los cuales los microorganismos y sus metabolitos pueden mejorar el recobro del petróleo. La tecnología microbial emplea ácidos orgánicos, gases, biosurfactantes in situ para limpiar y estimular los pozos, ya que a través de estas sustancias se puede eliminar la deposición de materia orgánica (la fracción pesada del crudo) e inhibir la deposición de materia orgánica (carbonatos y escamas de sulfato) en el pozo y cerca de las áreas de producción mejorando de esta manera el drenaje de petróleo hacia el interior del pozo. En el caso de extracción de petróleo utilizando la inyección de agua, esta es mejorada con la presencia de microorganismos en el agua, ya que los biosurfactantes y solventes producidos por estos permite extraer el petróleo residual atrapado dentro del espació poroso, aumentando la eficiencia de barrido del proceso²².

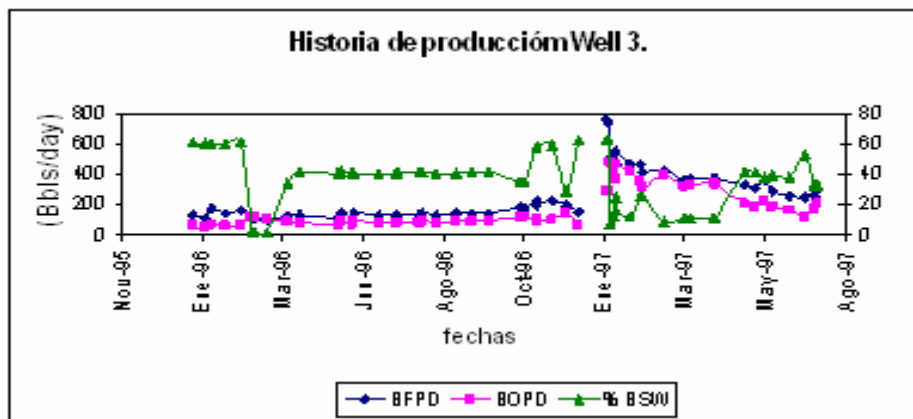
Una de las principales diferencias entre los solventes químicos tradicionales, agentes surfactantes, emulsificadores, etc los cuales se usan para mejorara el recobro de petróleo y los microorganismos, es que los tratamientos químicos dependen totalmente del movimiento de los fluidos a través del yacimiento como la única forma de transporte, mientras que los microorganismos pueden cubrir áreas mayores de petróleo y movilizar el crudo que se pensaba perdido²².

ILUSTRACIÓN N° 16. Historia De Producción Del Pozo 5



En esta figura podemos ver el incremento de la producción (línea rosada) de petróleo después del año 97 una vez aplicado el tratamiento bacteriológico

ILUSTRACIÓN N° 17. Historia De Producción Del Pozo 3



Al igual que en la figura anterior se aprecia el incremento de la producción de petróleo después del tratamiento bacteriológico (línea rosada año 97).

5.2.2 Biodesulfurización

Investigaciones en el mejoramiento del petróleo, a través de bioprocesos, específicamente en actividades de desulfurización por microorganismos, se están haciendo a nivel mundial.

Entre estas encontramos la realizada por el departamento de ingeniería de la universidad de Tottory Japón, quienes han progresado en aspectos prácticos y básicos en la desulfurización microbiológica. Entre los cuales se tiene la remoción del azufre en el petróleo, se ha discutido la importancia desde el punto de vista ambiental, ya que la combustión de compuestos con azufre producen oxido, que es unos de los principales productos de las lluvias ácidas. Por esta razón la regulación del contenido de azufre de los combustibles se han vuelto más exigente²³. Los procesos, a través de desulfuraciones químicas han empezado a ser inadecuados, para una desulfuración profunda que produzca combustibles con bajo contenido de azufre, es por ello que ha cobrado auge la biodesulfurización. Se han encontrado varios microorganismos capaces de desulfurizar el DBT, el cual es un compuesto representativo de los compuestos orgánicos con azufre presentes en el petróleo, ha través de esta desulfuración se forman compuestos libres de azufre, por ejemplo el

2-hidroxibifenil, estos microorganismos podrían actuar como biocatalizadores, asimilando el contenido de carbón y removiendo solo el azufre de los compuestos heterocíclicos. Por esta razón se proponen estudios enzimológicos y genéticos para lograr optimización de la actividad de los microorganismos, los genes envueltos en la desulfurización del compuesto DBT han sido aislados y se están haciendo estudios con la enzima correspondiente.

Otras investigaciones realizadas por M. J. Grossman y M. K. Lee, el 10 Julio de 1998 en el laboratorio de Stanford en California publicadas, se evaluó la habilidad de desulfurización de una bacteria llamada *Rhodococcus*, filtrada SRD-1 usando una fracción de destilado medio, entre 232 y 343 C (rango diesel) procedente del petróleo de Oregon. El experimento consistía en usar el diesel como única fuente de azufre para las colonias de bacterias. Compuestos como el tiofeno fueron removidos por el tratamiento microbiológico, el 50% de azufre que quedó después del tratamiento está en forma de óxido de azufre, la presencia parcial de óxido indica que el tiofeno se encuentra en la ruta de desulfurización de estas bacterias. Se obtuvo como resultado que las 2/3 partes del azufre fueron removidos por el tratamiento microbiano²⁴.

En las investigaciones realizadas en la Universidad de Dakota del Norte, se encontró un *Rhodococcus* filtrado del IGTS8 que posee una ruta enzimática la cual puede quitar el azufre del dibenzotiofeno sin romper los enlaces carbono-carbono. Hicieron un estudio genético de un fragmento de ADN de 4Kb BstBI-BsiWI encontrando los genes que codifican para esta ruta metabólica²⁵.

Mientras tanto en estudios realizados en el centro de bioingeniería de Korea, han aislado bacterias que desulfurizan el DBT, identificándola como *Gordonia* filtrada CYKS1. Estas bacterias transforman al DBT en 2-Hidroxibifenil y también puede usar otros compuestos orgánicos al igual que el DBT como fuente de azufre. En dos tipos de aceite diesel un destilado medio y un gasoil liviano contenía varios componentes de azufre incluyendo el DBT una vez aplicado el tratamiento microbiológico, el total de contenido de azufre disminuye considerablemente de 0.15% a 0.06% en el destilado medio y de 0.30% a 0.25% en peso en el gasoil²⁶. Por lo cual se considera que estas bacterias tienen un potencial de biosulfurización de los combustibles fósiles.

Rutas metabólicas seguidas por los microorganismos para la desulfurización y mineralización del DBT

Los microorganismos llevan a cabo la desulfurización, transformando los compuestos orgánicos, a través de rutas metabólicas, en las cuales intervienen enzimas que son producidas por estos. Uno de los compuestos más estudiados es el

dibenzotiofeno un compuesto aromático, con un heteroátomo de azufre. Este compuesto se usa como un modelo representativo de los compuestos que contienen azufre en el petróleo y se han encontrado a vías aeróbicas por las cuales los microorganismos eliminan el azufre del mismo.

ILUSTRACIÓN N° 18. Ruta 4s para desulfurización.

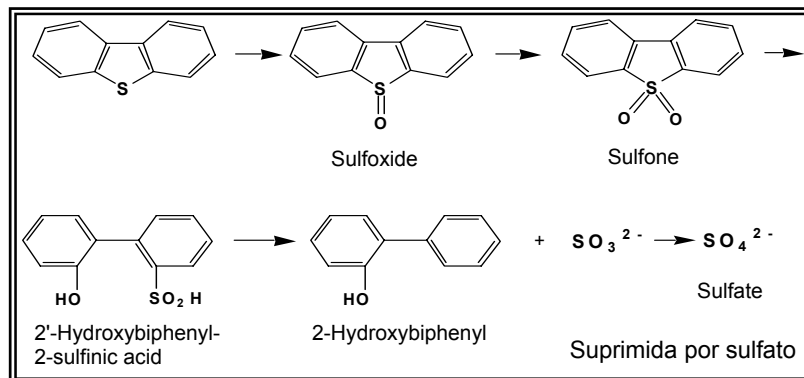


ILUSTRACIÓN N° 19. Ruta van Afferden

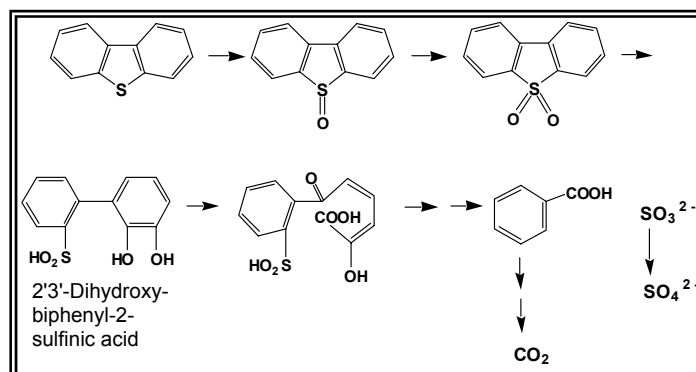
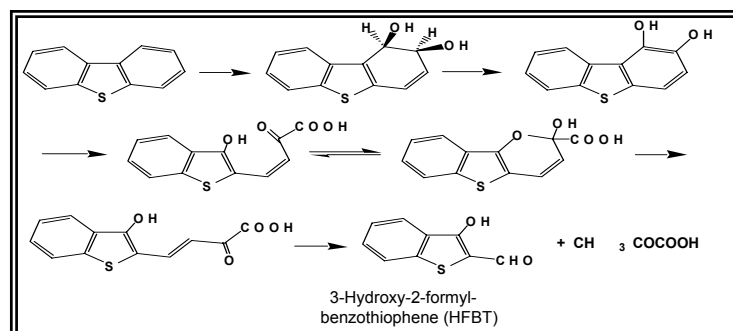


ILUSTRACIÓN N° 20. Ruta Kodama (1973)



No suprimida por sulfat

ILUSTRACIÓN N° 21. Otro Cometabolismo Para El DBT Sugerido Por KODAMA

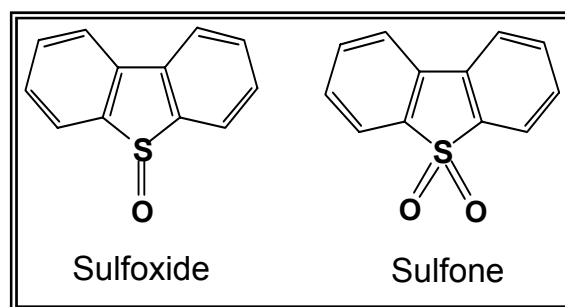
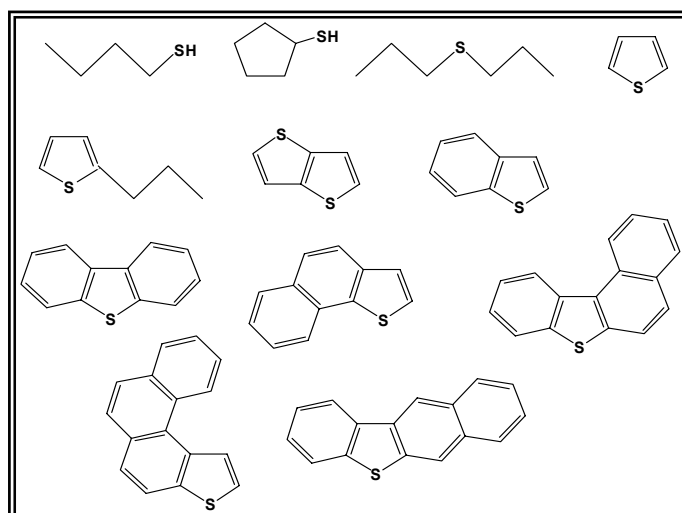


ILUSTRACIÓN N° 22. Compuestos Con Azufre Presentes En El Petróleo



5.2.3 Conversión bioquímica de los crudos pesados

Históricamente a condiciones de yacimiento y de superficie, el rol de los microorganismos era considerado predominantemente negativo, dirigido a formación de los crudos pesados debido a la biodegradación o acidez de los campos debido a la acción sulfato reductora de los microorganismos²⁷. Sin embargo estudios realizados de recuperación secundaria a través de bacterias han demostrado, que si se hace una selección de un grupo de microorganismos adecuada los efectos de éstas pueden dar resultados beneficiosos.. Estos efectos incluyen la formación de gases, surfactantes, solventes y ácidos in situ, y juegan un papel importante en el desarrollo de la tecnología para mejorar el recobro. Análogamente el uso de biomarcadores (y otros parámetros geoquímicos) que se utilizan para el estudio en procesos de maduración y migración del petróleo, y marcadores químicos que son empleados para monitorear

cambios químicos en el petróleo; han sido ampliamente estudiados en laboratorios con el propósito de estudiar los posibles cambios en la composición del petróleo debido a un grupo seleccionado de microorganismos. Estos microorganismos que producen conversión química en las principales fracciones del petróleo tales como saturados, aromáticos resinas y asfáltenos son llamados biocatalizadores. Estas conversiones suceden en forma inter e intra molecular, involucrando a los componentes polares del crudo. El estudio de las moléculas modelo del crudo y sobre crudo muestran una complejidad entre las interacciones entre la bacteria y el crudo. El uso de múltiples marcadores químicos a permitido monitorear estas interacciones y para un determinado grupo de bacterias estas suelen ocurrir en los sitios de los heteroátomos ocasionando la redistribución de las principales fracciones del petróleo así como una disminución del azufre, nitrógeno y trazas de metales²⁷.

En el trabajo realizado por Premuzic en conversión bioquímica de los crudos pesados se tomaron muestras de petróleo de los siguientes ubicaciones, costa afuera de California (OSC), Boscan de Venezuela (BOS), 2 crudos biodegradados pesados Cerro Negro (CN) y California Monterrey, Midway Subset (MWS). Fueron analizados los crudos tratados y sin tratar, sus contenidos de S, N y trazas de metales, el principal contenido de las fracciones y su distribución a través de cromatografía gases y espectrometría de masa, y el detector de elementos específicos. En algunos caso es valor de Carbond Conradson también fue determinado²⁷. La iteración entre los microorganismos y el petróleo muestran el siguiente análisis.

TABLA N° 3. Variación Del Contenido De Azufre

Variación en el contenido de azufre			
Oil	Cond inicial de azufre %	Biocatalizador	Reducción en el contenido de azufre %
CN	4.37	BNL-4-23	25
CN	4.37	BNL-4-24	29
MWS	1.1	BNL-4-23	50
OSC	4.4	BNL-4-23	45

TABLA N° 4. Variación Del Contenido De Níquel y Vanadio

Variación de Níquel y Vanadio				
Oil	Biocatalizador	Metal	Condi inicial ppm	Reducción en el cont de metales
CN	BNL-424	Ni	247	25
CN	BNL-425	V	494	38
CN	BNL-TH-29+	Ni	247	32
CN	BNL-TH-31	V	494	57
CN	BNL-2-45+	Ni	247	51
CN	BNL-3-26	V	494	68

TABLA N° 5. Determinación De Las Principales Fracciones (SARA) del crudo UTM851

Determinación de las Fracciones Principales SARA								
	UTM851							
	Crudo sin tratar	Tratado BNL-Z-3	Tratado BNL-TH-31	Tratado BNL-TH-29	Tratado BNL-4-21	Tratado BNL-4-22	Tratado BNL-4-23	Tratado BNL-4-24
Saturados%	19.19	23.62	22.01	24.72	32.29	28.72	34.42	29.21
Aromaticos%	45.15	31.64	35.64	28.62	32.04	33.87	29.72	19.59
Resinas %	31.23	38.94	38.94	43.44	32.00	33.31	32.71	38.20
Asfaltenos%	4.44	5.79	4.84	3.41	3.67	4.09	3.57	2.99

TABLA N° 6. Determinación De Las Principales Fracciones (SARA) del crudo OSC Y MWS

	OSC			MWS		
	Crudo sin tratar	Tratado BNL-4-22	Tratado BNL-4-23	Crudo sin tratar	Tratado BNL-4-22	Tratado BNL-4-23
Saturados%	17.3	45.5	51.6	19.2	33.7	66.3
Aromaticos%	39.1	18.0	20.5	44.9	29.1	11.2
Resinas %	37.4	30.1	22.3	35.3	34.2	10.3
Asfaltenos%	6.2	6.43	5.65	2.6	2.97	3.18

Todos los experimentos fueron realizados controlando el tiempo, presión y la temperatura. Los resultados indican que una amplia bioconversión a ocurrido en el petróleo por la acción de los biocatalizadores. En líneas generales hay un aumento de los saturados y una disminución de los compuestos aromáticos, azufre, nitrógeno y contenido de las trazas de metales²⁷.

En el presente trabajo de grado se pretende también lograr la bioconversión de los crudos pesados a través de catalizadores catalíticos, para mejorar propiedades físicas y químicas de los crudos.

CAPITULO VI LAS BACTERIAS

6.1. Efectos de la biodegradación del petróleo a través de microorganismos

En su mayoría los microorganismos producen, los siguientes cambios físicos en el crudo. La oxidación del petróleo durante la biodegradación esta dirigida hacia una disminución del contenido de hidrocarburos saturados y una pequeña disminución en el contenido de aromáticos, disminución de los grados API, mientras que el contenido de azufre, nitrógenos, metales, ácidos y viscosidad aumenta^{28,29,30}, lo cual explica la composición de los crudos pesados, y la teoría de que este es un crudo severamente biodegradado .

Sin embargo estudios realizados en conversión de los crudos pesados por Premuzic²⁷, mejoramiento del recobro por estimulación bacteriológica por Gabriela Trebau²², biodesulfurización por Fedorak y conversión de los compuestos por Fohg entre otros. Demuestran que es posible atacar solo los compuestos aromáticos de un crudo, con un grupo selecto de microorganismos con una actividad específica. Lo cual es el objetivo del presente trabajo, encontrar un grupo de microorganismos que tenga la capacidad de transformar las fracciones pesadas del crudo específicamente las fracciones aromáticas ,lo cual traería como consecuencia otras mejoras en las propiedades de los crudos pesados, tales como disminución de la viscosidad ,e implicaciones asociadas con la refinación y producción de los crudos pesados

Para encontrar microorganismos con esta capacidad es necesario, hacer una búsqueda de un grupo seleccionado de bacterias, ya que comúnmente la mayoría de los microorganismos utilizan como fuente de alimento y energía a los compuestos livianos del crudo y después en un menor grado los pesados como lo sugiere la escala de biodegradación de Meter y Moldowan, escala de Wenger.

ILUSTRACION N° 23. Escala De Wenger

		Level of biodegradation						
Scale of Peters and Moldowan (ref. 34)		0	1	2	3	4	5	6-10
Scale of Wenger et al. (ref. 16)		None	Very slight	Slight	Moderate	Heavy		Severe
C ₁ -C ₅ gases	Methane‡							→
	Ethane							→
	Propane							→
	Isobutane							→
	n-Butane							→
	Pentane							→
C ₆ -C ₁₅ HCs	n-Alkanes							→
	Isoalkanes							→
	Isoprenoid alkanes							→
	BTEX aromatics							→
	Alkylcyclohexanes							→
C ₁₅ -C ₃₅ HCs	n-Alkanes, isoalkanes							→
	Isoprenoid alkanes							→
	Naphthalenes (C ₊₁₀)							→
	Phenanthrenes, dibenzothiophenes							→
	Chrysenes							→
C ₁₅ -C ₃₅ biomarkers	Regular steranes							→
	C ₃₀ -C ₃₅ hopanes							→
	C ₂₇ -C ₂₉ hopanes							→
	Triaromatic steroid hydrocarbons							→
	Monoaromatic steroid hydrocarbons							→
	Gammacerane							→
	Oleanane							→
	C ₂₁ -C ₂₂ steranes							→
	Tricyclic terpanes							→
	Diasteranes							→
	Diahopanes							→
	25-Norhopanes‡							→
N†	Alkylcarbazoles							→
O*	Carboxylic acids‡							→

* Ref. 14 - - - - - Minor removal ‡ Produced and destroyed during biodegradation
† Ref. 21 ——— Major alteration
 ————— Removal
 ··········· Methane generation and possible destruction

Algunos conceptos referidos a las bacterias son importantes conocer para el desarrollo experimental del presente trabajo, tales como:

6.1.2. Crecimiento bacteriano:

Crecimiento es el aumento ordenado de todos los componentes bioquímicos de un organismo. En las bacterias el resultado más obvio del crecimiento, es el aumento en el número de células, y su multiplicación.

Existe una gran variedad de formas para cultivar bacteria y depende no solo de los requerimientos intrínsecos del microorganismo, sino también del uso que se le dé al cultivo. Por ejemplo si se quiere cultivar un microorganismo para aislarlo, bajo la forma de un cultivo puro, o si se desea estimar la población viable de un cultivo, será mejor usar medios de cultivo sólidos o semisólidos, ya que este tipo permite el crecimiento individualizado del microorganismo en colonias o clones. Por otro lado si el objetivo es cosechar grandes poblaciones, o analizar la cinética del crecimiento, deberán emplearse medios de cultivo líquidos³¹.

Existen factores biofísicos que inciden en el crecimiento, que son controlados por los componentes del medio tales como el PH, el agua y la presión osmótica. Otros factores son controlados por el medio ambiente la temperatura, el oxígeno y la presión. El potencial de oxido, su reducción es controlado por la composición del medio y el ambiente. El conjunto de estos factores inciden en la velocidad del crecimiento, la producción de biomasa, el patrón metabólico y la composición química del organismo.

El análisis de los componentes de las células microbianas muestra que alrededor del 95% del peso seco celular esta integrado por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio y hierro. El conjunto de estos elementos es denominado macronutrientes, debido a que los microorganismos los requieren en cantidades relativamente grande para su crecimiento. C, O, H, N, S y P. Son componentes integrantes de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Otros componentes como K, Ca, Mg y Fe, son requeridos para diversas funciones tales como actividad enzimática cofactores enzimáticos, formación de complejos con el ATP, estabilización de ribosomas, integrantes de citocromos. El crecimiento celular requiere de otros elementos denominados micronutrientes que son requeridos en cantidades mínimas o en trazas y ellos son Mg, Zn, Co, Mo, Ni, Cu los cuales participan como cofactores en la actividad de algunas enzimas o como cofactores en reacciones catalíticas o para el mantenimiento de la estructura de la proteína³¹.

Algunas bacterias tienen requerimientos nutricionales particulares los cuales no pueden sintetizar y que colectivamente son denominados factores de crecimiento: (1) Aminoácidos, requeridos en la síntesis de proteínas; (2) purina y pirimidina, para la síntesis de ácidos nucleicos y (3) vitaminas que actúan como parte de cofactores o como cofactores enzimáticos, las bacterias que requieren para su crecimiento este tipo de cofactores se llaman auxotróficas. Las autotófas tienen requerimientos nutricionales muy simples como agua, dióxido de carbono y sales inorgánicas

adecuadas. Los factores de crecimiento de los organismos heterótrofos varían cualitativamente dependiendo de la composición del medio de cultivo³¹.

6.1.3. Medios de cultivo

El trabajo de microbiología depende de la capacidad de los microorganismos para crecer y mantenerse en las condiciones de laboratorio, ellos solo es posible si se poseen medios de cultivo adecuados que cubran todos los requerimientos nutricionales de los microorganismos en cuestión, además, para el aislamiento e identificación de los distintos microorganismos es necesario contar con medios especiales formulados con las características del hábitat natural del microorganismo³².

Desde el punto de vista de su composición los medios de cultivo pueden ser indefinidos los cuales son muy ricos en nutrientes debido a que en su composición se utilizan hidrolizados de proteínas u otros compuestos orgánicos naturales por ejemplo (peptona, triptona, cacerina, leche, sangre, etc.) que suministran energía y fuente de carbono; sales inorgánicas para satisfacer los requerimientos de iones y también pueden contener extracto de levadura que satisfagan las posibles necesidades vitamínicas. Ejemplo de estos medios son: Caldo de cultivo, LB, Agar Levine, etc.

Existen diferentes tipos de medios los selectivos, son medios de composición definida, que permiten el crecimiento de un determinado genotipo de un microorganismo. Por ejemplo medio mineral suplementado con lactosa, en concentración conocida en el cual solo podrán crecer aquellas bacterias capaces de utilizar lactosa como única fuente de carbono.

Los medios de cultivo pueden prepararse en fase líquida, o en fase sólida semi sólida utilizando agar como soporte. La selección de un medio de cultivo en general dependerá del propósito que se consigue con un cultivo dado³².

6.2. Forma en que las bacterias transforman los compuestos

Las bacterias transforman los sustratos y compuestos del medio ambiente, para obtener energía y alimento a través de las enzimas, es importante la comprensión de las mismas para entender la manera en que trabajan los microorganismos.

6.2.1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos, ellas tienen un poder catalítico muy grande incluso mejor que muchos catalizadores sintéticos. Las enzimas tienen un alto

grado de especificidad de acuerdo al sustrato³³. Existe una enzima para cada sustrato así que teniendo la enzima adecuada se puede transformar un sustrato específico sin alterar otro. En nuestro caso esta característica de las enzimas es muy útil, se pueden transformar una molécula específica del crudo sin alterar otras.

ILUSTRACION N° 24. Actividad Enzimática En Un Sustrato.



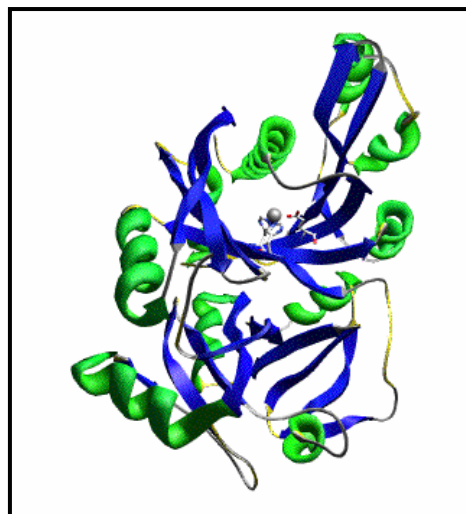
Definición: una enzima es una proteína, es decir, una secuencia de aminoácidos, con una configuración espacial muy precisa y con una actividad catalítica propia. En todas las células, desde la más sencilla hasta las más complejas, como las que forman nuestro organismo se consigue: (a) una o varias moléculas de ADN, ácido desoxirribonucleico, compuesto de una secuencia de nucleótidos de cuatro tipos (adenina, citocina, guanina y timidina). (b) Una gran variedad de proteínas (alrededor de 3000 diferentes en la bacteria más estudiada y con más de 20 tipos distintos de aminoácidos). (c) lípidos o azúcares o polímeros de estos. (d) 70% de agua y moléculas pequeños intermediarios, así como sales y ciertos metales, en muy baja concentración. Siempre se cumple que la información genética acumulada en la secuencia del ADN es copiada parcialmente en otra molécula intermedia llamada mARN (ácido ribonucleico mensajero) con la información necesaria para sintetizar un tipo de proteína. La secuencia de nucleótidos determina a través del código genético universal la secuencia de aminoácidos en la proteína sintetizada (cada tres nucleótidos corresponden a un aminoácido). La síntesis de las proteínas se realiza en una estructura supramolecular (compuesta de proteínas y ácidos nucleicos estructurales) llamada ribosoma, las moléculas que traducen el código genético son los ácidos ribonucleicos de transferencia (tARN) que pueden enlazar, de manera reversible en un extremo, un aminoácido, correspondiente al código (de transnucleotidos) que muestra

en otro extremo de la molécula. El universo de enzimas (o proteínas) diferentes es tan grande que es posible encontrar cualquier especificidad³⁴.

6.2.2. Estructura de una enzima

Para entender como podría funcionar una enzima es necesario entender su estructura, como se logra la estabilidad necesaria para garantizar su especificidad. Una proteína esta constituida por una serie de aminoácidos covalentes a través del enlace péptido común a todos ellos, son 20 aminoácidos; primeramente los aminoácidos con grupos no polares, que son también llamados grupos hidrofóbicos, ya que son los grupos menos solubles en agua. Los segundos son los grupos polares o hidrófilo, ya que son solubles en agua formando enlaces de hidrogeno y por ultimo, los aminoácidos que se encuentran cargados negativamente o positivamente. A la secuencia de aminoácidos se les conoce como su estructura primaria. El número y la posición de estos enlaces constituye la estructura secundaria de la proteína, algunas veces estos enlaces mantienen unidos dos o más cadenas de aminoácidos. La estructura terciaria corresponde a su forma espacial o forma nativa y los arreglos típicos espaciales³⁴.

ILUSTRACION N° 25 . Estructura de una Enzima (Dioxigenase)



6.2.3. Actividad enzimática

Dentro de la célula todos los pasos intermedios, que van desde la glucosa, por ejemplo, hasta una proteína o un ácido nucleico se realizan mediante enzimas específicas, la producción o el número de copias de cada enzima es muy variada.

6.3. Producción de enzimas a gran escala

Una vez caracterizada la enzima o el compuesto enzimático, y hechas las optimizaciones del microorganismo usado para producirla, su producción a gran escala son un problema técnico resuelto, corresponde a la producción mediante grandes fermentadores de unas 5 a 10 ton. Por día de peso seco de biomasa, para asegurar la cantidad necesaria en el procesamiento de cantidades del orden de 100.000 barriles diarios, en pocos días (10 días). Los fermentadores necesarios para estas escalas son accesibles en este momento comercialmente³⁴.

6.4. Las enzimas y su utilización tecnológica

La tecnología enzimática tiene como objetivo la superación de todos aquellos inconvenientes que parecen retrasar la aplicación de las enzimas en estos procesos a escala industrial, las enzimas son proteínas cuya función biológica es catalizar las reacciones que suceden en las células. Las fuentes de enzimas pueden ser de origen vegetal, animal o microbiano. Esta área tiene aplicaciones desde tiempos remotos como la fermentación, actualmente en diferentes industrias a diferentes niveles, ya que implica la utilización de sistemas enzimáticos diversos que optimizan el procesamiento en la obtención de detergente, aditivos alimenticios, productos químicos y farmacéuticos. La tecnología enzimática se presenta como alternativa biotecnológica basada en que las industrias desarrollen productos de calidad homogénea, aprovechen óptimamente sus materias primas, aceleres sus procesos de producción, minimicen desperdicios y disminuyan el deterioro del medio ambiente.

La tecnología enzimática en el tratamiento de desechos, donde la biotecnología puede tener un mayor impacto a nivel mundial. Los Estados Unidos gastan US\$ 40 mil millones al año para combatir la contaminación que generan los 600 millones de toneladas de desechos industriales. Bacterias, microalgas, levaduras, hongos y plantas han mostrado una notable eficiencia para metabolizar residuos orgánicos, xenobióticos y metales pesados (biorremediación y fitorremediación), reduciendo hasta 20 veces el costo involucrado en la incineración de dichos residuos. Por otra parte, se han hecho

grandes avances en el tratamiento de derrames de petróleo con microorganismos. Además de estas hidrólisis de materiales poliméricos, existen también aplicaciones de enzimas capaces de degradar compuestos altamente tóxicos que podrían inhibir procesos de tratamiento basado en el empleo microbiológico. Un ejemplo específico es el uso de la peroxidasa de la cola de caballo para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas que se presentan en muchas industrias con aguas residuales³⁴.

En términos más amplios, es posible anticipar que los procesos basados en el empleo de organismos contruidos genéticamente para degradar los compuestos indicados anteriormente, podría representar un proceso mucho más económico.

CAPITULO 7

JUSTIFICACIÓN EXPERIMENTAL

Tomando en consideración el modelo molecular de los crudos, en el cual se plantea que el crudo esta constituido por ramas y troncos, los troncos representan los compuestos aromáticos y heterocíclicos, mientras que las ramas los compuestos saturados y alifáticos. Entonces se esta buscando microorganismos con actividad enzimática especifica capaces de abrir los anillos aromáticos (los troncos del crudo), sin afectar las ramas del crudo, para que este no pierda su valor agregado. Esta apertura de anillos aromáticos generaría más ramitas y menos troncos, lo cual es una característica de los crudos livianos. De esta forma se lograría cambiar las propiedades físicas y químicas del crudo, disminuir viscosidad, densidad, contenido de azufre y metales.

ILUSTRACIÓN N° 25. Compuesto Aromático (Naftaleno).

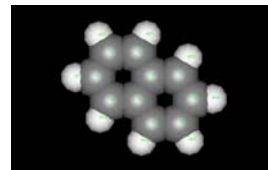
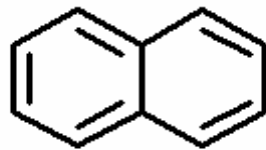
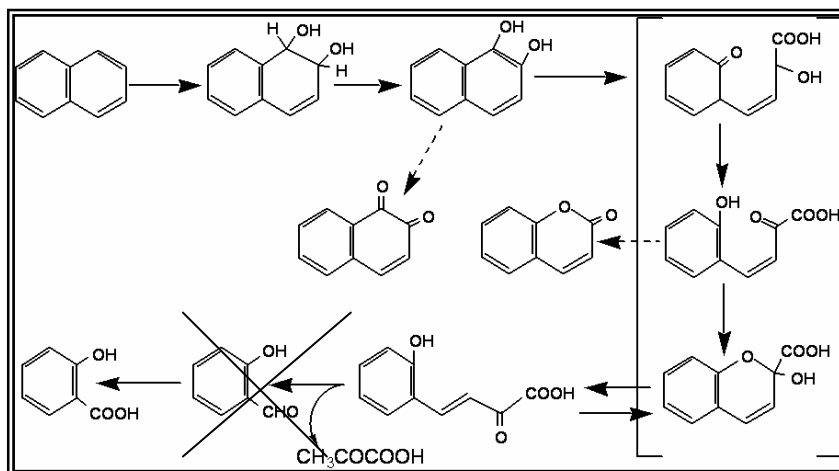


ILUSTRACIÓN N° 25. Mineralización del Naftaleno



La figura ilustra la apertura de una molécula aromática el naftaleno (tronco), hasta cierto sustrato de manera que disminuye su peso molecular, dejando una ramita pegada a la molécula, esta es la forma de actividad específica deseada que tengan las bacterias sobre las moléculas del crudo.

El procedimiento de estudio conlleva varias etapas, una etapa inicial donde se desea aislar un micro organismo, que sea capaz de modificar las características de los crudos pesados, presentes en la faja petrolífera del Orinoco, tales como densidad, viscosidad, tensión superficial, desulfurización u otra característica relevante de los crudos pesados.

Las bacterias se encuentran en todas partes, sin embargo las bacterias sometidas a factores biofísicos y bioquímicos particulares es probable que sean capaces de producir cambios en el crudo, esta registrado en la literatura las bacterias de origen marino presentan una alta actividad en procesos de desulfurización, por esta razón es probable que una bacteria marina, sea capaz de alimentarse del crudo de Cerro Negro, y tomar a este como fuente de carbono y oxígeno, sin embargo no se pueden descartar la búsqueda de microorganismos en cualquier lugar donde existan altas actividades con azufre, si lo que se quiere es desulfurizar el crudo tales como bacterias presentes en las plantas, en el suelo y en lugares de altas contaminaciones tales como rellenos sanitarios.

Las bacterias recolectadas en nuestro caso de del lecho marino de Mochima, y del lago de asfalto mas grande del mundo Guanoco (Venezuela Edo. Sucre) se sometieron primero a un medio selectivo donde la fuente carbono y azufre es una emulsión del crudo de Cerro Negro, y después a un medio selectivo donde la fuente de carbono y azufre es residuo de vacío del crudo de Cerro Negro, para el caso de las bacterias de Guanoco la emulsión solo se utiliza como fuente de carbono. Las bacterias que crezcan en estos medios selectivos son posibles candidatas a realizar, cambios a nivel molecular en el crudo. Para tener una medida del control del crecimiento de las poblaciones se crecieron muestras de inóculos tomados de los medios selectivos en medios sólidos de agar con LB, en los cuales se contabilizo el número del crecimiento y se puede tener una medida del tamaño de las poblaciones.

Como el petróleo es una mezcla de hidrocarburos, entonces surge el problema de que las bacterias podrían estar creciendo alimentándose de moléculas de compuestos alifáticos livianos como fuente de carbono y tomando el azufre que se encuentra en estos compuestos, y no de las moléculas de crudo pesado asfáltenos,

aromáticos etc. Entonces para descartar esta posibilidad se decidió poner en un medio selectivo las bacterias aisladas donde la fuente de carbono y azufre son moléculas modelos conocidas como el Alfa metil naftaleno AMN, El dibenzotiofeno DBT, Naftaleno, Phenantreno y Hexadecano. El Naftaleno, DBT, Phenantreno, AMN son todos compuestos aromáticos y ayudan a predecir el comportamiento de las bacterias en estos compuestos. El Hexadecano es un compuesto saturado y también ayuda a descartar actividades de las bacterias no deseadas en nuestro caso. Para tener un conteo del crecimiento de la población se tomaron inóculos de muestra y fueron sembrados en medios sólidos de LB y también visualmente se observa el crecimiento bacteriano de acuerdo con la turbidez del medio. También se decidió aislar bacterias bajo este medio selectivo, sin embargo hay que tomar en consideración que la restricción para el crecimiento de las bacterias se dificulta en este tipo de medios.

Una vez encontrada la bacteria que realiza el proceso deseado es decir que actúa sobre compuestos específicos (aromáticos) bien sea conversión del crudo, desulfurización, desmetalización o cualquier otro; se puede probar directamente en el crudo el microorganismo, optimizando las condiciones ideales para que este actúe en el crudo, tales como PH, aireación, cantidad de masa biológica. Para ello es necesario el entendimiento del microorganismo aislado, otra opción es realizar un proceso genético en el cual se aísla el gen de la bacteria que codifica para la enzima que actúa en un sustrato específico, introducir esta información en un microorganismo y clonarlo en grandes cantidades, para luego colocarlo en el crudo. Otra opción es producir solamente la enzima se clona en grandes cantidades; para luego ser utilizada directamente en el petróleo. Para este trabajo se ha empleado directamente el microorganismo y extractos celulares.

Es interesante hacer notar que las tasas de transformación de las enzimas son muy altas, sin embargo cuando es el microorganismo o bacteria y no la enzima obtenida, la transformación llevada a cabo por el microorganismo puede ser mucho más lenta (no comercial).

El siguiente paso sería la selección de las mejores condiciones para la realización de la transformación del crudo a través de las enzimas la literatura esta llena de ejemplos una opción sería la siguiente:

En una emulsión de agua-crudo se colocaría la enzima en el agua, esto garantizaría una buena superficie de contacto entre el crudo y las enzimas, además se podría recuperar las soluciones enzimáticas por separación de fase.

Otra forma sería la inmovilización de las enzimas en unos soportes adecuados por donde circularían las suspensiones de agua crudo.

Mezclas de enzimas fijadas a un soporte con el crudo y posterior recuperación por filtrado. Una vez realizada la selección del proceso adecuado, el escalamiento de la producción de enzimas dependerá del grado de transformación de todo el crudo, y de un análisis de costos, el cual debe incluir en cuanto tiempo se recuperara la inversión y cuanto serán las ganancias de las mejoras al crudo. Las cantidades de producción de enzima en grandes fermentadores producirían de 5 a 10 toneladas de biomasa por día, la cual garantizaría transformación de cantidades de 100000 barriles diarios, por un periodo de tiempo de 10 días

CAPITULO VIII

EXPERIMENTOS

Lo primero fue seleccionar el lugar de donde se tomaran las muestras. En este caso las muestras provienen del lecho marino de Mochima Edo Sucre Venezuela y del Lago de Asfalto de Guanoco Edo. Sucre Venezuela.

En el Laboratorio de Biotecnología de IDEA (Sartenada Edo Miranda) se realizó, primero el aislamiento de los microorganismos, bajo las condiciones de interés, con el propósito de obtener organismos individuales o poblaciones específicas. Después se caracterizaron cada uno de los microorganismos para saber su actividad en moléculas específicas. El siguiente paso es colocar los microorganismos en el crudo, esto se puede hacer colocando una bacteria aislada, consorcios de bacterias, extracto celular, enzimas purificadas, o combinaciones. El crudo es colocado en su forma natural o en emulsiones de agua petróleo en cantidades para poder medir cambios físicos químicos.

1 Aislamiento de bacterias

1: Aislamiento de bacterias de Mochima y observación de cambios cualitativos en el crudo.

Se decidió someter la muestra proveniente del lecho marino de Mochima ha una presión selectiva la cual, consistía en 1% de de emulsión petróleo/ agua como fuente de carbono y azufre, un medio líquido compuesto por sales, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y micro elementos.

Se realizan varios pases con el fin de establecer una selección de las posibles bacterias candidatas a alimentarse de esta forma. Los pases consisten en poner a las bacterias bajo un medio en el cual se establecen las variables de alimentación de las cuales se alimentaran las bacterias.

De esta forma se aíslan las bacterias que utilizan el hidrocarburo como fuente de carbono y azufre.

Este experimento también tiene como meta observar de manera cualitativa los posibles cambios en el hidrocarburo tales como densidad, viscosidad, tensión superficial y estabilidad de la emulsión agua/petróleo, que podrían ser producidos debido a la actividad bacteriológica. Los microorganismos que se aíslan son después utilizados en el tratamiento del crudo.

Materiales e Instrumentos:

- ✓ Medio líquido M9 (6gr Na₂ HPO₄ 3gr KHPO₄ 0.5gr NaCl 1gr NHCl₄ por 1litro de H₂O) Emulsión de crudo Cerro Negro.
- ✓ Solución de micro elementos (5 gr MgCl₂6H₂O, 0.66gr MnCl₂2H₂O, 0.68gr MnSO₄H₂O, 1gr NaCl, 1 gr FeCl₃, 0.1 gr CaCl₂6H₂O, 0.01 gr CuCl₂6H₂O, 0.01 gr CuSO₄5H₂O, 0.08ZnCl₂, 0.17 gr ZnSO₄7H₂O, 0.05 gr AlCl₃, 0.01 gr H₃BO₃, 0.04 gr NaMoO₄2H₂O, 0.08CoCl₂6H₂O)
- ✓ Cloruro de calcio
- ✓ Cloruro de magnesio
- ✓ Muestra de arena y agua
- ✓ Incubadora VWR
- ✓ Frascos de 350ml
- ✓ Autoclave
- ✓ Balón aforado
- ✓ Balanza digital
- ✓ Pipetas graduadas

Procedimiento experimental

Se preparó el M9 pesando en la balanza digital las cantidades de 6 gr Na₂ HPO₄ 3gr KHPO₄ 0.5gr NaCl 1gr NHCl₄, se diluyo en agua y se colocó en una balón aforado, enrasando este hasta la cantidad de un litro, se preparo bastante M9 ya que este se utilizo en la mayoría de los experimentos como medio líquido.

Se preparó la solución de microelementos pesando en la balanza digital las cantidades de 5 gr MgCl₂6H₂O, 0.66gr MnCl₂2H₂O, 0.68gr MnSO₄H₂O, 1gr NaCl 1 gr FeCl₃, 0.1 gr CaCl₂6H₂O, 0.01 gr CuCl₂6H₂O, 0.01 gr CuSO₄5H₂O, 0.08ZnCl₂ 0.17 gr ZnSO₄7H₂O, 0.05 gr AlCl₃, 0.01 gr H₃BO₃, 0.04 gr NaMoO₄2H₂O, 0.08CoCl₂6H₂O) se diluyo en agua en un balón aforado y después se enraso hasta 1 litro.

Se esterilizan los frascos, el M9, la emulsión petróleo /agua y todos los requerimientos en el autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 PSI

Para realizar el primer pase en la selección de posibles bacterias que se alimenten de la emulsión agua /petróleo, se colocaron 25 ml de agua y 25 ml de arena, 150 ml de M9, 20 µl de solución 2M de CaCl₂, 400 µl de solución 2M de MgCl₂, 1000 µl de solución de microelementos y 2 ml de emulsión en un frasco de 350 ml. Se coloco el frasco dentro de la incubadora a una temperatura de 37°C y 220 rpm. Se

dejo creciendo durante un periodo de tiempo de 3 a 6 días de acuerdo con la cantidad de crecimiento de las bacterias con el tiempo.

Para, los siguientes pases se tomo un inculo de 1 ml del pase que le precedía y las mismas cantidades tanto de requerimientos como de emulsión petróleo/agua , se realizaran tantos pases como fueron necesarios para aislar las bacterias.

2 Medidas de crecimiento poblaciones de las cepas de Mochima

Este experimento es una parte del experimento # 1, ya que se hace necesario tener una medida del número de células presentes en cada pase en función del tiempo y además conocer cuantos fenotipos diferentes de células se encuentran en cada pase. Se realizó conteo celular en todos los experimentos que estuvieron sometidos a condiciones aeróbicas.

Materiales y Equipo:

- ✓ Cápsula de petri
- ✓ Agar (Bacto triptona)(Difco)
- ✓ Autoclave
- ✓ Pipetas graduadas
- ✓ Ependorf de 1ml
- ✓ Rastrillo
- ✓ mechero
- ✓ Alcohol
- ✓ Muestra líquida de bacterias
- ✓ LB Medio rico(sigma)
- ✓ Solución de M9
- ✓ Balanza digital

Procedimiento experimental

Se preparó el medio sólido donde fueron colocadas las bacterias, se colocaron 2 gr de LB y 1.5 gr de agar por cada 100 ml en un frasco semi tapado de 350 ml. Se introdujo en el autoclave a 15 PSI y 121 °C para esterilizar la solución, después se saco del autoclave la solución y se colocó en una cápsula de Petri a temperatura ambiente, y se espero hasta que se solidificara la solución.

Para realizar un conteo celular, lo primero que se hizo fue suponer un titulo inicial de bacterias del medio a estudiar, en este caso los frascos del experimento #1,

de acuerdo con la turbidez y número de días de incubación se supuso un título inicial, entonces se seleccionó un número de diluciones, a la cual se sometió la muestra, para obtener un número de colonias de bacterias que se podrían contar a simple vista. Por ejemplo para una suposición título inicial de 10^7 células por mililitro se realizan diluciones de 10^4 y 10^5 , esperando obtener en las cápsulas de Petri alrededor un valor de 1000 a 100 colonias respectivamente, valores que se pueden contar visualmente.

El proceso consiste en tomar un mililitro de muestra de los frascos del experimento #1 y colocarlo en un ependorf, y si el caso es realizar una dilución 1/100 se toman 10 μ l con la pipeta de la muestra y se colocan en un ependorf conjuntamente con 990 μ l de M9. Después de realizar las diluciones adecuadas se toman 100 μ l de muestra y se colocan gota a gota en el medio sólido y con un rastrillo esterilizado con un mechero y alcohol se esparcen las gotas por toda la superficie del medio, se procede a colocar las cápsulas en la incubadora a 37 °C, al día siguiente se realiza un conteo celular de las colonias que crecieron y se visualizan los diferentes fenotipos aislados, lo que permite saber si ha aislado una bacteria en particular o varias que sobreviven bajo la presión selectiva a la cual esta sometidos los frasco del experimento # 1.

3. Bacterias de Mochima sometidas a una emulsión de residuo de vacío del crudo Cerro Negro como única fuente de carbono y azufre.

Las bacterias aisladas del experimento #1, se colocaron en un medio en el cual la fuente de carbono y azufre, es residuo de vacío y los requerimientos de las bacterias, este experimento tiene la finalidad de ver si los microorganismos son capaces de cambiar al residuo de vacío, bien sea desulfurizándolo o modificando su estructura molecular.

Materiales y equipo:

- ✓ Residuo de vacío de Cerro Negro(emulsión)
- ✓ Requerimientos CaCl_2 , MgCl_2 , micro elementos
- ✓ Incubadora
- ✓ Muestras del experimento #1

Procedimiento experimental

Se tomo un inculo de las bacterias, que se encontraban en las cápsulas de Petri y que provenían de los frascos del experimento #1, se coloco en un frasco que

contenía 2ml de residuo de vació en una emulsión, 250 ml de medio líquido M9, 25 μ l de solución de CaCl_2 , 500 μ l de solución MgCl_2 y 1250 μ l de microelementos. Después se dejó incubando a 37°C y 220 rpm por un periodo de tiempo de 3 a 6 días.

4. Bacterias de Mochima sometidas a moléculas modelo como única fuente de azufre DBT, y única fuente de carbono AMN y Naftaleno.

Los hidrocarburos están compuestos por una mezcla de sustancias, alifáticos, alquenos, resinas, aromáticos y asfaltenos, en el caso de una emulsión agua petróleo además posee un surfactante, entonces es difícil saber cuál de los compuestos usan las bacterias como fuente de carbono, por esta razón se decidió someter a las bacterias, aisladas del experimento #1, a una molécula modelo como el (AMN) Alfa Metil Naftaleno que represente los compuestos pesados presentes en los hidrocarburos, y otra molécula modelo para el estudio de fuentes de azufre como el dibenzo Tiofeno DBT, el cual junto con el tiofeno representa el 70% del azufre presente en los crudos pesados, también se utilizó el Naftaleno que es otra molécula modelo de los crudos pesados.

Se realizaron varias combinaciones de las moléculas a ser usadas como fuente de alimento por las bacterias, Naftaleno/ MgSO_4 bajo estas condiciones el naftaleno es tomado como fuente de carbono y el MgSO_4 como fuente de azufre, AMN/DBT en este caso el AMN es tomado como fuente de carbono y el DBT como fuente de Azufre y carbono, AMN/ MgSO_4 en este caso el AMN es la fuente de carbono y el MgSO_4 es la fuente de azufre, otra combinación es DBT/Succinato en este caso el Succinato es un compuesto del ciclo de Krep y por lo tanto es un catalizador de los procesos de las bacterias, sirve como fuente de carbono y el DBT como posible fuente de azufre, también se colocaron en DBT como única fuente de carbono y azufre.

Materiales y equipo:

- ✓ M9 medio analítico
- ✓ DBT, AMN, Naftaleno, succinato; MgSO_4 , kerosén, glucosa
- ✓ CaCl_2 , MgCl_2
- ✓ Micro elementos

- ✓ Muestras de las bacterias aisladas del experimento # 1, sembradas en cápsulas de Petri en medios sólidos de LB y agar, crecidas en LB líquido
- ✓ Fiolas de 250 ml
- ✓ Ependorf
- ✓ Vortex
- ✓ Centrifuga

Procedimiento experimental

Se tomo una colonia de bacterias provenientes del medio sólido LB y agar con un palillo, esta se coloco en un ependorf de 1 ml conjuntamente con Medio líquido M9, se resuspendieron las bacterias en el medio líquido colocando el ependorf en el vortex, después se centrifugaron las bacterias y se le retiro el sobre nadante se le coloco M9 nuevamente y se resuspendieron las bacterias nuevamente colocando el ependorf en el vortex, este proceso se repitió tres veces para lavar las bacterias y eliminar de esta forma posibles residuos de azufre o carbono, que hayan quedado adherido a las bacterias.

Entonces, se coloco en una fiola de 20 ml de medio líquido M9 estéril , 100 μ l de microelementos 2 μ l de CaCl_2 2M, 40 μ l MgCl_2 2M , se añadió la fuente de carbono (AMN,DBT, glucosa , Succinato o Kerosén) y la fuente de azufre (DBT, MgSO_4) y 100 μ l de muestra , todos estos pasos se realizaron bajo condiciones de esterilidad ,para lograr este objetivo ,todas las soluciones fueron colocadas en el autoclave y cuando se colocaron en las fiolas se hizo con el mechero encendido y trabajando cerca de este. El siguiente paso fue dejar incubando por un periodo de tiempo de 3 a 6 días a 37C y 220rpm.

También se realizaron conteo celulares iguales a los del experimento número 2 para tener un control del crecimiento de las poblaciones de bacterias.

5. Bacterias de Mochima sometidas a DBT como única fuente de azufre y Naftaleno como única fuente de carbono en medios sólidos agar.

Las bacterias aisladas del experimento #1, fueron puestas en medios sólidos en un agar (cápsula de Petri), se colocó DBT como fuente de azufre y carbono, en otro caso se colocó naftaleno una molécula modelo de los crudos pesados como fuente de

carbono y DBT como fuente de azufre, y un tercer caso con Naftaleno unicamente como fuente de carbono ,y para fuente de azufre se utilizo el azufre que se encuentra en pequeñas cantidades en el agar.

Materiales y equipo:

- ✓ Cápsulas de petri
- ✓ Agar
- ✓ Fuente de carbono(DBT, Naftaleno)
- ✓ Muestra de bacterias tomada del experimento #1

Procedimiento experimental

Se colocaron las bacterias en una cápsula de Petri en un medio sólido de agar, se les colocó cristales de DBT como fuente de carbono y azufre en un caso, y en otro caso se le colocaron las bacterias en otra cápsula de Petri en el mismo medio sólido agar y se les puso naftaleno como fuente de carbono y DBT como fuente de carbono y azufre.

6. Bacterias de Mochima sometidas a condiciones anaeróbicas en distintas fuentes de carbono y azufre.

Las bacterias fueron colocadas bajo condiciones anaeróbicas en un medio rico LB para determinar una posible actividad anaeróbica de las mismas, se les agrego KNO_3 para suplir la fuente de electrones, que aporta el oxígeno en condiciones aeróbicas necesaria para que las bacterias crezcan.

Se pusieron también en condiciones anaeróbicas con emulsión petróleo/agua, y diferentes fuentes de carbono y azufre utilizando moléculas modelo de los crudos pesados y KNO_3 .

Materiales y equipo:

- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Incubadora
- ✓ Muestra de bacterias aisladas
- ✓ M9, LB, Aceite comestible, KNO_3 , DBT, AMN, glucosa, succinato, MgSO_4
- ✓ Requerimientos MgCl_2 , CaCl_2 y micro elementos.

Procedimiento experimental

Se diluyo LB en un medio líquido M9 y se colocó en un tubo de ensayo, se agrego KNO_3 y las bacterias aisladas en experimento #1, a las cuales se le asignó el nombre de Bm1, Bm2 y Bm3. Después se le agregó una capa de aceite a para aislar el medio del oxígeno.

También se realizaron varios casos variando las fuentes de carbono y azufre para cada una de las bacterias Bm1, Bm2 y Bm3. Se colocó una combinación de fuente de carbono y azufre diferente para cada caso. Las tres bacterias aisladas en el experimento #1 son sometidas a cada caso en tubos ensayo. Los casos son los siguientes: se coloca M9 líquido en un tubo de ensayo y una de las siguientes combinaciones de fuente de carbono y azufre (AMN/DBT, AMN/DBT/ MgSO_4 , AMN/ MgSO_4 , DBT, DBT/ MgSO_4 , DBT/Succinato, Succinato), los requerimientos , KNO_3 y las bacterias aisladas Bm1, Bm2 y Bm3 .Luego se coloca una capa de aceite para aislar el tubo de ensayo de oxígeno, y se colocan en la incubadora a 37°C , por un periodo de 3 a 6 días.

7. Curva de crecimiento para una bacteria de Mochima sometidas a diferentes fuentes de carbono y azufre.

Se realizo una curva de crecimiento en el tiempo de las bacterias aisladas en experimento #1, en este caso trabajamos solamente con la Bm1, y se sometió a moléculas modelo.

Materiales y equipo:

- ✓ Espectrómetro de absorbancia óptica
- ✓ Cubetas de medición de absorbancia óptica
- ✓ Muestra de bacterias Bm1
- ✓ Fiolas
- ✓ Requerimientos de las bacterias
- ✓ Fuentes de carbono y azufre

Procedimiento experimental

Se colocó en fiolas de 250 ml el medio líquido M9, el requerimiento de las bacterias y las moléculas modelo de fuente de carbono y azufre de crudos pesado

Se prepararon controles con todas las sustancias en cada caso sin las bacterias, necesarios para medir el valor de absorbancia óptica de estos primero y luego por diferencia con el valor de las muestras en cada caso establecer el valor de absorbancia de los mismos, entonces, se tomó un inóculo de cada caso, el cual se colocó en las cubetas de medición de absorbancia óptica y se midió a 600 nm el valor de absorbancia de cada uno de los casos, estas mediciones se repitieron en el tiempo para realizar una curva de crecimiento.

8. Observación de cambios cualitativos en la densidad del crudo del experimento #1 .

Se colocaron las muestras de crudo conjuntamente con todo el medio del experimento #1, al final se había roto la emulsión y se podían observar las gotas de petróleo en el medio salino. El medio salino se bota y se llena el recipiente con agua destilada para observar algún cambio de densidad en el crudo, ya que este crudo antes del tratamiento es más denso que el agua no flota y una vez tratado, si existe una disminución en la densidad, entonces flota.

Materiales y equipo:

- ✓ **Frascos de 1L**
- ✓ Todo el medio del último pase del experimento #1
- ✓ Agua destilada

Procedimiento experimental

Se colocó 750 ml de agua destilada en un frasco de 1l y se le agregó la muestra completa del último pase

Nota : De aquí en adelante se realizaron los experimentos con todas las cepas del laboratorio Mochima, 1er viaje a Guanaco, suelo de Sarteneja, y del Cacao.

9. Mantenimiento de las bacterias en la nevera

Una vez que se tienen células aisladas o consorcios de bacterias que realizan funciones interesantes bien sea en crudo o en las moléculas modelos estas son

mantenidas en una nevera a -20 o -70 C en soluciones al 20% de glicerol, con el objetivo de tener las células disponibles, para usos futuros

- Materiales y equipos
- Solución de glicerol
- Nevera

Procedimiento experimental

Se toma un 1 ml del medio líquido donde se encuentre creciendo el microorganismo que se quiera guardar y se coloca en un ependorf, con 125 µl de solución de glicerol, después se guarda en la nevera el ependorf a -70°C.

10. Starvation de azufre

Del experimento # 4 se determino que existía una cantidad de azufre residual en el medio salino M9, entonces quedaron descartados los experimentos con DBT, por lo tanto se elaboro una nueva metodología para manejar esta variable y cubrir todos los casos posibles y tener mas control de esta forma de la desulfurización bacteriológica en el DBT.

Este experimento es un paso previo al experimento de desulfurización del DBT, y en este se quiere, eliminar el azufre residual de los medio de cultivo M9, colocando las bacterias a crecer con una pequeña fuente de carbono y el azufre residual del medio. También se desea observar cuanto es el crecimiento debido al azufre residual, para compararlo con el crecimiento en presencia del DBT.

Materiales y equipos:

- Solución Salina de M9
- Inoculo de bacterias
- fiolas
- Incubadora

Procedimiento experimental:

Se tomo una colonia de bacterias provenientes de un medio sólido o líquido, se lavo con M9 tres veces las células para eliminar residuos de otros medios y se colocaron en 6 fiolas que contenían:

Fiola1 20 ml de M9 ,2µl de solución de CaCl₂, 0,1 mM Succinato, 100 µl de solución de microelementos, 40 µl de solución 2M MgCl

Y las otras 5 fiolas con lo mismo. Después de 3 días comienza el experimento #11

11. Desulfurización del DBT o experimento de los 6 frascos se realizo para todas las cepas Mochima y Guanoco.

A los 3 días de haber realizado el experimento (starvation) se colocan en las 6 fiolas los requerimientos restantes, de esta manera se puede comparar entre el crecimiento inicial debido al azufre residual, y el siguiente crecimiento debido al DBT, si hay un aumento en el número de células o un cambio físico en el medio con respecto a la condición inicial este está asociado directamente con el DBT. El experimento consiste en 6 fiolas que contienen: fiola 1 0,1mMsuccinato M9+ requerimientos (micro elementos , CaCl₂, MgCl), fiola 2 2mM MgSO₄, 10 mM succinato +M9+requerimientos sin Mgcl, fiola 3 10 mM Succinato fiola 4 DBT/10mMSuccinato +M9+ requerimientos, fiola 5 DBT, fiola 6 2mM MgSO₄, lo cual da un mejor entendimiento de la situación.

La Fiola 1 permite ver la magnitud del crecimiento asociado a una pequeña fuente de carbono y al azufre residual.

La fiola 2 permite observar la magnitud del crecimiento máxima

La fiola 3 permite ver la magnitud del crecimiento máximo asociado al azufre residual.

La fiola 4 toma en cuenta los resultados anteriores y se puede ver si el DBT es desulfurizado.

La fiola 5 permite observar la mineralización del DBT.

La fiola 6 permite visualizar la ruptura de los anillos del DBT con una fuente de azufre adicional.

Materiales y equipo

- Medio líquido M9
- DBT, Succinato, MgSO₄, CaCl₂, Micro elementos
- Inoculo de bacterias
- fiolas de
- Incubadora

Procedimiento experimental

A las 6 fiolas del experimento anterior (Starvation) se le agrego a cada una lo siguiente

Fiola1 nada

Fiola 2mMSO₄, 10mMsuccinato

Fiola 3 10mM succinato

Fiola DBT/10mM succinato

Fiola 5 DBT

Fiola 6 DBT, 2mMSO₄

11. Despertar de las células

Las células cuando no se están usándose estas se mantienen en la nevera para conservarlas, entonces es necesario despertarlas cuando se requiere utilizarlas, para esto se utiliza por lo general un medio rico LB donde las células crecen con gran facilidad.

Materiales y equipo

Medio rico LB

Fiolas

Inoculó de bacteria

Palillo estéril

Procedimiento experimental:

Se toma de la nevera que se encuentra a -20 o -50 un enpendorf que contiene la bacteria congelada al 20% en glicerol, y en condiciones de esterilidad (trabajando cerca del mechero), se toma con un palillo estéril del enpendorf que contiene bacteria un trozo de medio liquido con bacterias congelado y se agrega en 20 ml de LB en una fiola, después se deja durante 24 horas creciendo en la incubadora a 30 °C y 220 rpm, para obtener un cultivo fresco de la bacteria.

12. Inducción de las bacterias en una molécula determinada

Las células aisladas son inducidas antes de ser puestas en las emulsiones o directamente en el crudo, esta inducción se lleva acabo poniendo a crecer las células en una molécula modelo Naftaleno (aromático presente en el petróleo), esto es para que la célula adapte su maquinaria enzimática al catabolismo de este compuesto y después le sea más fácil actuar a la célula en moléculas similares presentes en el crudo, se toma un inoculo de estas células previamente lavado , para colocarlo

después en la emulsión. También las células fueron puestas en Phenantreno, hexadecano y ciclohexano para ver si estas eran capaces de crecer en estos medios.

Materiales y equipos

- Medio Líquido M9
- Solución de micro elementos
- Solución de $MgSO_4$
- Solución de $CaCl_2$
- Micro Pipetas
- Puntas
- Naftaleno
- Fenantreno
- Hexadecano
- Ciclohexano
- Mechero

Procedimiento experimental

Se tomo 200 μ l de un cultivo fresco de la bacteria que se quería despertar y se lavaron las bacterias tres veces para eliminar cualquier residuo de LB, después en condiciones de esterilidad (se trabajo cerca del mechero y todos los equipos e instrumentos que se utilizaron fueron esterilizados en el autoclave,) se tomo 200 μ l con la micropipeta y se colocaron en un medio liquido que contenía 2 μ l de una solución de $CaCl_2$ 2M , 40 μ l de una solución de $MgSO_4$ 2M , 100 μ l de solución de microelementos, y 1gr de naftaleno resuspendido en M9, se dejo en la incubadora a 30°C y 200 rpm durante 24 horas, por lo general pero esto dependía de la fase de crecimiento de la bacteria. Y se obtuvo un cultivo de bacterias con la capacidad de alimentarse de naftaleno.

Nota : para poner a crecer en otra molécula modelo el procedimiento es igual ,solo que se utiliza la molécula adecuada según el caso fenantreno, hexadecano ,ciclohexano.

13. Tratamiento bacteriológico sobre emulsiones de agua y petróleo.

Se utilizó una emulsión petróleo /agua 70/30, se emplea una emulsión en lugar de crudo, para aumentar el área de contacto entre las bacterias y el crudo, con la finalidad de darle a las bacterias mayor accesibilidad al crudo, por otro lado la fase acuosa permite a las bacterias un medio adecuado para su crecimiento, se comenzó con esta relación y posteriormente se variaron las relaciones petróleo agua, 63/37 , 50/50, 20 /80, con un volumen total de 200 ml, y bacterias correspondientes a una solución saturada de 20ml.

Equipos e instrumentos:

- Experimento
- Fiolas
- Incubadora
- Solución de microelementos , Solución de $MgSO_4$ 2M, $MgCl_2$, solución de $FeSO_4$ 5M, solución de $CaCl_2$ 2M ,
- Emulsión (petróleo/agua =70/30)
- Incubadora

Procedimiento experimental

Se tomo 20 ml de cultivo de bacterias previamente crecido en LB, el cual se lavo tres veces con agua destilada, para eliminar los residuos de este medio rico en LB, luego se resuspendió las bacterias en la cantidad de M9 adecuada según la relación petróleo/agua que se deseaba, por ejemplo para obtener una relación (63/37= petróleo/agua) se suspendieron en 6 ml de M9 las bacterias ,después se colocaron las bacterias en un frasco que contenía 143 ml de emulsión (petróleo /agua =70/30), con todos los requerimientos necesarios para la vida de las bacterias 15 μ l de solución 2M $CaCl_2$, 300 μ l de solución 2M $MgSO_4$,750 μ l de solución de microelementos y solución de $FeSO_4$ de manera que sea 0,1M del total ,entonces se colocó el frasco en la incubadora por un periodo de 5 días, a una temperatura de acuerdo con las características de las bacterias (30C y 200rpm).Y se obtuvo un crudo tratado bacteriológicamente.

Nota: El experimento se repitió variando la cantidad de medio M9 colocada en el frasco, para obtener distintas relaciones petróleo/agua 50/50 y 20/80. El experimento se repitió varias veces con diferentes microorganismos. Otra variación fue la cantidad de microorganismos puestos en el medio desde 20 ml hasta 1% del medio. También se varió el medio de procedencia de los microorganismos, en algunos casos el inóculo provenía de LB, medio líquido Naftaleno, o de una emulsión (petróleo /agua) con gran cantidad de agua.

14. Extracto celular

Este experimento se realiza cuando se quiere romper las células, para que las enzimas que se encuentran dentro de estas puedan actuar sobre el crudo, ya que existe cierta restricción de la membrana celular, esto impide el paso de ciertos compuestos hacia el interior de la célula. Después de rotas las células y de tener una concentración grande de enzimas se colocan estas en la emulsión agua /petróleo.

Materiales y equipos

- Beadbeater
- Buffer fosfato
- Cultivo fresco de células
- Nevera

Procedimiento experimental

Se tomó 250 ml de un cultivo fresco de células, se lavan y se colocan las células en un bufer fosfato que debe ser previamente enfriado 0°C después ubican las células en el BeadBeater y se rompen para obtener el extracto celular.

15. Tratamiento bacteriológico con extracto celular en una emulsión petróleo en agua.

Este experimento tiene el propósito de poner en contacto las molécula del crudo con las enzimas que se encuentran dentro de la célula. Una vez obtenido el extracto celular este se coloca en una emulsión petróleo/agua, para obtener un crudo transformado por las enzimas.

Materiales y equipos:

- Solución de buffer fosfato
- Solución de microelementos
- Solución de $MgSO_4$
- Solución de $CaCl_2$
- Pipetas
- Puntas
- Mechero

Procedimiento experimental:

Se colocó el extracto celular en una solución 80/20, 50/50, 30/70 buffer fosfato/emulsión (petróleo/agua =30/70), el proceso es instantáneo sin embargo se puede dejar 24 horas en la incubadora, para obtener crudo transformado por las enzimas.

16. Separación de las fases después del tratamiento bacteriológico

Una vez realizado el tratamiento bacteriológico en una emulsión petróleo/agua esta por lo general se encuentra separada en varias fases, petróleo agua con sales, residuo de surfactantes y biomasas de bacterias en el medio acuoso, como interesa medir las propiedades del crudo, entonces se disminuyo el pH del medio agregando ácido acético y agua destilada lo cual facilita la separación de las fases y la eliminación de la biomasa presente en las fases, para luego poder medir las propiedades físicas del crudo tratado. Si la cantidad de crudo es grande este experimento también sirve para cualitativamente apreciar un cambio de densidad y viscosidad, en crudos con densidades mayores a la del agua, ya que al separar las fases se puede colocar el crudo en agua destilada y observar como es su comportamiento en la misma.

Equipos e instrumentos:

- Agua destilada
- Acido acético
- Fiola con la muestra

Procedimiento experimental:

Al medio se le agrega una gota de ácido acético y se agita, después se le agrega agua destilada para aumentar la cantidad de agua facilitando que la biomasa se disuelva en el agua con facilidad, después el agua se bota y se lava varias veces el crudo con agua destilada, para obtener una fase de crudo, en el cual se pueden realizar medidas de sus propiedades físicas.

Nota: una vez lavado el crudo este se ubica completamente sumergido en agua destilada, y si el crudo flota se trata de una medida de la densidad la cual es menor a la del agua y si por el contrario no lo hace el crudo es más denso que el agua.

17. Tratamiento bacteriológico para una gota de crudo Cerro Negro

Este experimento fue llevado a cabo directamente en crudo cerro negro, consiste en colocar una bolita de crudo y colocarla en un medio líquido, con una cantidad grande de bacterias en relación con la cantidad de crudo, con el objetivo de observar algún cambio de densidad o viscosidad debido a la acción de las bacterias

Materiales y equipos:

- Plancha de calentamiento
- Viales
- Crudo Cerro Negro
- Medio Líquido M9
- Solución de micro elementos
- Solución de $MgSO_4$
- Solución de $CaCl_2$
- Pipetas
- Puntas

Procedimiento experimental:

Se calienta crudo cerro negro hasta 60°C, para que fluya se toma una gota de crudo con una pipeta Pasteur, la gota se deja caer en el medio líquido que contiene 9

ml de m9 ,10 ml de bacterias suspendidas en un 1 ml, 1 μ l de solución de CaCl_2 2M , 20 μ l de solución de MgSO_4 2M, 50 μ l de solución de microelementos y se coloca en la incubadora por un periodo de tiempo de 5 días a 30 °C y 200 rpm. Para obtener una gota de crudo tratado bacteriológicamente.

18. Medida de densidad de una gota de petróleo de crudo Cerro Negro

Para medir la densidad de una gota de petróleo de crudo Cerro Negro, ante y después del tratamiento bacteriológico, se realizó teniendo control de la densidad del medio, entonces de manera indirecta se calcula la densidad de la gota de crudo de acuerdo con la flotabilidad de la misma en el medio. Como el crudo Cerro Negro no flota en agua la gota petróleo se va hacia el fondo del vial , entonces se va agregando una solución salina al agua de densidad conocida hasta ver que la gota de petróleo flota, al flotar se sabe la concentración exacta de sales del medio. Después se puede preparar una solución con la concentración requerida, se mide su masa en la balanza y con una micropipeta y se obtiene el volumen, para después calcular la densidad con una relación matemática, la densidad obtenida es la misma que la de la gota de petróleo.

Materiales y equipo

- Micro pipetas
- Muestra de gota de petróleo
- Solución salina
- Balanza electrónica

Procedimiento experimental

En el vial donde se encuentra la gota de petróleo, el medio líquido y la biomasa de bacterias se vota el medio, sin dejar completamente vacío el vial para que la gota no se pegue del fondo por fuerzas viscosas, entonces se agrega agua destilada y se repite el procedimiento de votar el medio líquido, una vez lavada la gota de petróleo y retirado los restos de biomasa y medio salino, se llena el dial hasta 9 ml de agua destilada, y se comienza agregar las cantidades de solución salina conocida hasta que flote la gota de petróleo. Después se prepara una solución con la concentración exacta con que flotó la gota y se mide su volumen con la micro pipeta y la masa con la balanza electrónica, después se calcula la densidad como masa/volumen. Todo esto

para obtener el valor de la densidad de una gota de petróleo antes y después del tratamiento bacteriológico.

Nota: este experimento solo sirve para crudos con densidad mayor a la del agua, y que después del tratamiento bacteriológico su densidad aun siga siendo mayor a la del agua. El experimento para ser llevado a cabo en gotas con mayor densidad a la del agua, sería necesario un fluido con densidad conocida y menor a la del agua, y que el crudo no fuese soluble en el mismo.

19. Medida de densidad del crudo recuperado de la emulsión tratada

El crudo recuperado de la emulsión se calienta a una temperatura de 90 a 100 °C, para evaporar los residuos de agua, y después se mide la densidad a través del método del picnómetro. La densidad del crudo se mide antes y después del tratamiento bacteriológico.

Materiales y equipos:

- Picnómetros
- Plancha de calentamiento
- Termómetro

Procedimiento experimental:

Una vez eliminada el agua del crudo por evaporación de esta a una temperatura de 90 a 100 °C, el crudo se colocó en el picnómetro, se dejó enfriar hasta que este alcanzó la temperatura ambiente, y después se pesó en la balanza electrónica, el picnómetro también se pesó vacío entonces por diferencia se obtuvo la masa del crudo, luego mediante la relación masa/volumen se calcula la densidad del crudo.

De la siguiente forma:

V_w = volumen del picnómetro lleno de agua

V_o = volumen del picnómetro lleno de petróleo

V_p = volumen del picnómetro

M_w = masa de agua

M_o = masa de petróleo

M_p = masa del picnómetro

M_{po} = masa del picnómetro lleno con petróleo

M_{pw} = masa del picnómetro lleno con agua

P_o = Densidad del petróleo

P_w = Densidad del agua (se obtiene de las tablas según la temperatura)

$V_o = V_w = V_p$ (por ser el volumen constante)

$$P = M/V \quad , \quad V = M/P$$

$$M_o/P_o = M_w/P_w$$

$$P_o = (P_w * M_o) / M_w$$

$$M_o = M_{po} - M_p$$

$$M_w = M_{pw} - M_p$$

$$P_o = P_w * (M_{po} - M_p) / (M_{pw} - M_p) = \text{Densidad del petróleo}$$

$$\gamma = P_o / P_w \text{ (gravedad específica)}$$

$$\text{API (@ 15,4 °C)} = 141,5 / \gamma - 131,5 \quad (\text{grados API})$$

Nota: es importante que el capilar del picnómetro se encuentre completamente lleno, que no quede gas atrapado en el crudo en el momento de llenar los picnómetros, ya que estos factores afectan el volumen del crudo en el picnómetro y por lo tanto alteran el valor de la densidad. El capilar del picnómetro puede quedar completamente lleno en el momento en que se llena el picnómetro y después por una reducción de la temperatura en el crudo tener una disminución en el volumen de crudo en el capilar este fenómeno es importante de controlar para tener una buena medida de densidad por este método.

20. Medidas de viscosidad

La viscosidad es medida en el crudo tratado recuperado de la emulsión y en el crudo sin tratar, para ver de qué manera varía esta característica del crudo. Este experimento consiste en dejar pasar el crudo a través de un orificio de diámetro

conocido a una temperatura de 98°C y medir el tiempo que tarda en llenarse un recipiente de 60 ml. Después con la correlación indicada se obtiene el valor de viscosidad del crudo en centistokes.

Materiales y equipos:

- Plancha de calentamiento
- Viscosímetro de Saybol
- Termómetro
- Cronometro
- Recipiente de 60ml

Procedimiento experimental:

La muestra de crudo Cerro Negro tratado bacteriológicamente se calienta , hasta 60°C para que fluya, se vierte en el orificio superior de viscosímetro de Saybol, y se coloca un termómetro en el crudo hasta que se alcanza la temperatura de 98 °C, entonces se retira el tapón del orificio de abajo y se pulsa el cronometro y se mide el tiempo hasta que el crudo llena un recipiente hasta cierta marca que indica 60 ml , después con este tiempo se entra en la correlación indicada y se obtiene el valor de la viscosidad del crudo en centistokes @ 98°C.

Viscosidad de furol de saybol(seg) = centiestokes*b

B(@ 98,8 °C) =0.4792 constante depende de la temperatura

Viscosidad en centiestokes= viscosidad de furol de Saybol/.4792(t)

21. Medida de las fracciones presentes en el crudo (SARA) por HPLC

Este experimento permite visualizar cambios en las fracciones del crudo, contenido de Saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos antes y después del tratamiento bacteriológico, para establecer comparaciones y saber las moléculas sobre las cuales están actuando la actividad enzimática de las bacterias.

Materiales y equipo

- Iso-propanol
- Heptano

- Tolueno
- Barritas de sílice o aluminio
- Cromatógrafo de capa fina (TLC lastrocan MK-5 con detector FID)

Procedimiento experimental:

Se toman 25 mg de crudo, se diluye en 1 ml de tolueno-cloroformo 1:1, se inyecta 2 µl de solución en las barritas sílice, para el caso de los asfáltenos, se sumergen las puntas de las mismas por 20 minutos en 70 ml de una mezcla isopropanol heptano 5:95 y por presión capilar la mezcla impregna toda la barrita y los asfáltenos son separados del crudo por solubilidad, luego la porción de asfáltenos es quemada por la llama y la cantidad de iones es contabilizada por el detector de iones dando como resultado el % de asfáltenos en el crudo, para el caso de los saturados se sumergen las puntas de las barritas por 38 minutos en heptano y 16 minutos en tolueno, y se repite el procedimiento anterior, las resinas se calculan por diferencia.

22. Medida del % de asfáltenos

Este experimento tiene el propósito de determinar el porcentaje de asfáltenos en el crudo antes y después del tratamiento bacteriológico. Consiste en diluir en tolueno el crudo pesado para volverlo un líquido, y luego mezclar la solución con heptano, para que precipiten los asfáltenos.

Materiales y equipos:

- Tolueno
- Crudo
- Heptano
- Papel de filtro
- Embudo
- Plancha de calentamiento
- Agitador magnético
- Balanza electrónica

Procedimiento experimental:

Se calienta el crudo hasta 60°C para que fluya se colocan 10 ml de crudo en un recipiente graduado, y se espera hasta que se alcance la temperatura ambiente, se pesa el recipiente antes y después de que es llenado con crudo, por diferencia se calcula la masa de crudo, el crudo se mezcla con 20 ml de tolueno y se agita hasta tener una solución homogénea, después se mezcla con 600 ml de heptano y se deja en agitación durante 24 horas, entonces se filtra la mezcla y se recoge en un papel de filtro el precipitado que representan los asfaltenos presentes en el crudo pesado, esta cantidad de sólidos se pesan en una balanza electrónica, y el porcentaje que representa la cantidad de sólidos de la muestra inicial de crudo es el porcentaje de asfaltenos.

23. Aislamiento de cepas bacterianas del lago de asfalto de Guanoco (Edo. Sucre Venezuela). 2do viaje a Guanoco

Este experimento tiene el propósito de aislar cepas presentes en el lago de asfalto más grande del mundo, que tengan actividad específicas sobre los compuestos más pesado del crudo, es decir hacer una selección de bacterias capaces de crecer utilizando al crudo como fuente de carbono. A diferencia del experimento #1, en este se utilizó una solución de 2M $MgSO_4$ como fuente de azufre y no el petróleo, ya que estas cepas están enfocadas es hacia la conversión de los compuestos aromáticos presentes en el crudo más que la desulfurización de estos.

Experimento similar al # 1 fue llevado a cabo para las muestras provenientes de Guanoco, con pequeñas variaciones. El aislamiento se hizo sometiendo a las bacterias a dos presiones selectivas diferentes, en un caso la relación emulsión medio salino M9 fue 2% en uno y en otro 20%. El petróleo en este caso solo era utilizado como fuente de carbono por que se le agrego al medio una solución 2M $MgSO_4$ como fuente de azufre, y no se agrego $MgCl_2$ al medio. Y la temperatura de aislamiento fue de 30°C.

Materiales e Instrumentos:

- ✓ Medio líquido M9 (6gr $Na_2 HPO_4$ 3gr $KHPO_4$ 0.5gr NaCl 1gr $NHCl_4$ por 1litro de H_2O) Orimulsión de crudo Cerró Negro

- ✓ Solución de micro elementos (5 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.66gr $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.68gr $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1gr NaCl, 1 gr $FeCl_3$, 0.1 gr $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01 gr $CuCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01 gr $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.08gr $ZnCl_2$, 0.17 gr $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 gr $AlCl_3$, 0.01 gr H_3BO_3 , 0.04 gr $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.08gr $CoCl_2 \cdot 6H_2O$)
- ✓ Cloruro de calcio
- ✓ Cloruro de magnesio
- ✓ 10 Muestra diferentes
- ✓ Incubadora VWR
- ✓ Frascos de 350ml
- ✓ Autoclave
- ✓ Balón aforado
- ✓ Balanza digital
- ✓ Micro Pipetas

Procedimiento experimental

Se preparó el M9 pesando en la balanza digital las cantidades de 6 gr Na_2HPO_4 , 3 gr KH_2PO_4 , 0.5gr NaCl, 1gr NH_4Cl , se diluyo en agua y se coloco en una balón aforado, enrasando este hasta la cantidad de un litro..

Se preparó la solución de micro elementos pesando en la balanza digital las cantidades de 5 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.66gr $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.68gr $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1gr NaCl 1 gr $FeCl_3$ 0.1 gr $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01 gr $CuCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01 gr $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08gr $ZnCl_2$ 0.17 gr $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 gr $AlCl_3$ 0.01 gr H_3BO_3 0.04 gr $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.08gr $CoCl_2 \cdot 6H_2O$) se diluyo en agua en un balón aforado y después se enraso hasta 1 litro.

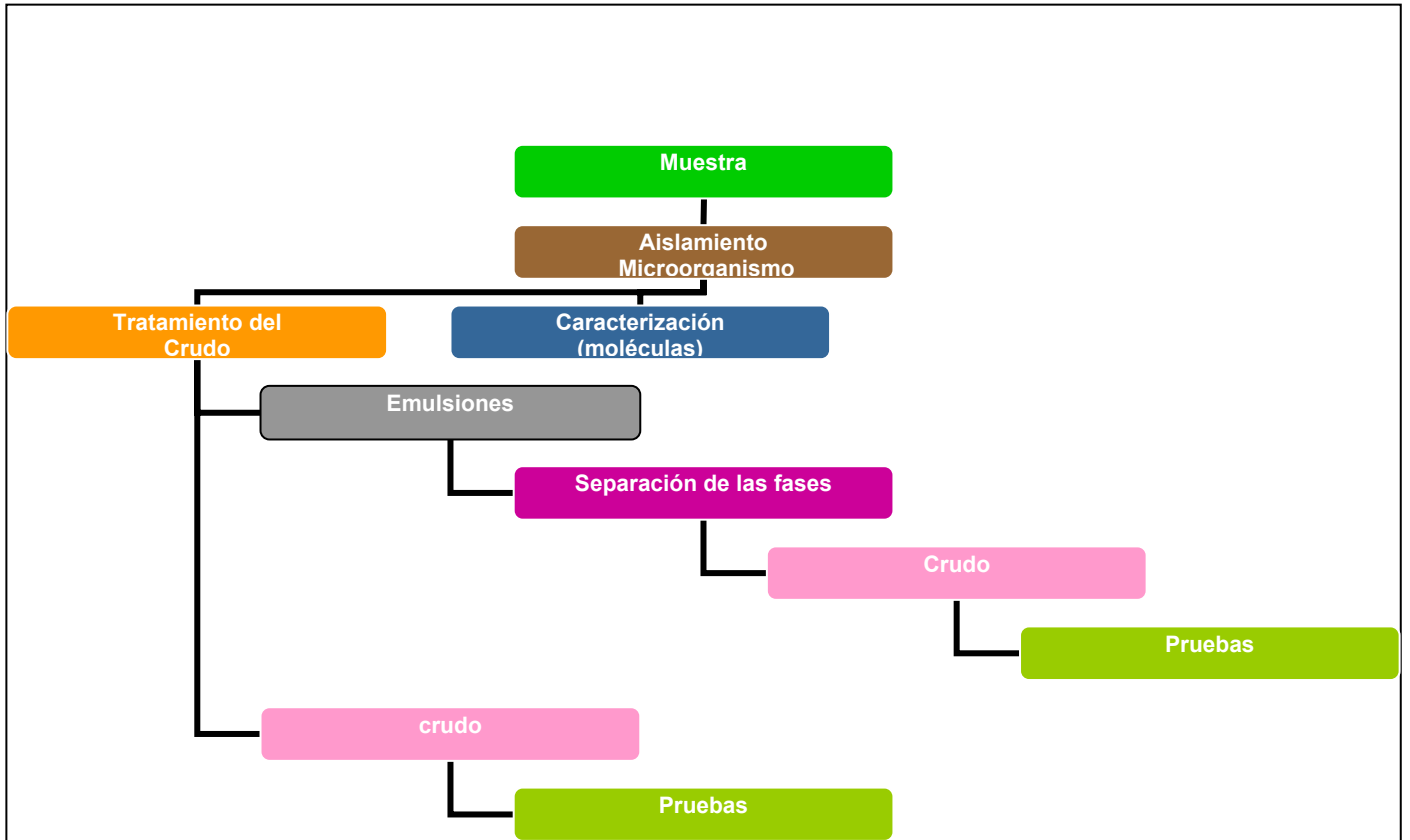
Se esterilizaron los frascos, el M9 y todos los requerimientos en el autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 15 PSI

Para realizar el primer pase en la selección de posibles bacterias que se alimenten de la emulsión petróleo/ agua, para el caso de 20% se colocaron 4 gr de muestra, 10 ml de emulsión, 40 ml de medio líquido M9, 5µl de solución 2M $CaCl_2$, 100 µl de solución 2M $MgSO_4$, 250 µl de solución de microelementos y en un frasco de 225 ml, y para el caso de 2% se colocaron 4gr de muestra, 1ml de emulsión, 49 ml de M9, 5µl de $CaCl_2$, 100 µl de $MgSO_4$, 250 µl de micro elementos. Las fiolas se colocaron dentro de la incubadora a una temperatura de 30°C y 200 rpm. Se dejo creciendo durante un periodo de tiempo de 4 a 5 días de acuerdo con la cantidad de crecimiento de las bacterias con el tiempo.

Mejoramiento De Los Crudos Pesados Con Actividad Bacteriológica.

Para, los siguientes pase se tomo un inculo de 1ml del pase que le precedía y las mismas cantidades tanto de requerimientos como de emulsión, se realizaran 5.

Etapas de los experimentos



CAPITULO XI

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Aislamiento de bacterias de Mochima y observación de cambios cualitativos en el crudo.

En cuanto al **experimento # 1** que consistía, someter a las bacterias a una presión selectiva, se logro aislar las bacterias que se alimentan de una emulsión petróleo/agua. Se perciben cambios en el crudo que son producidos por las bacterias en la emulsión. Sin embargo es complicado tener una percepción cualitativa en los cambios del crudo cuando se utilizan pequeñas cantidades de emulsión. El control más probable que se obtiene, es una capa de crudo en la superficie y otra en el fondo, ya que los componentes pesados se van al fondo y los livianos se quedan en la superficie, sin embargo se demostró experimentalmente que parte del crudo puede estar en la superficie y no necesariamente ser liviano, sino que por fuerzas de atracción, forma un arreglo conjuntamente con otros compuestos livianos en la superficie. Esto quedo en evidencia a través del **experimento # 8** cuando se llevó toda la muestra a un recipiente con mayor cantidad de agua destilada y se dejó por un tiempo prolongado en la incubadora. Observándose que la cantidad de crudo que se va hacia el fondo es mayor que la que permanece en la superficie, ya que este es crudo pesado de Cerro Negro y tiene una densidad mayor a la del agua, el aumento de la cantidad de crudo que se va hacia el fondo, se debe a la ruptura del arreglo que existía en la superficie, entre crudos pesados, livianos y surfactante, esto sugería un cambio de densidad ficticio, además de fuerzas de tensión superficial. Otra cosa que ayudó aclarar este problema es que las gotas de crudo se encontraban en momentos en la superficie y posteriormente en el fondo, cosa que no puede ser posible si hubiese ocurrido un cambio de densidad en el crudo. Además cada muestra tomada puede ser distinta en su composición. La temperatura de la incubadora también cambia la morfología del crudo. Únicamente se pueden percibir cambios ópticos de densidad y viscosidad cuando son evidentes.

Para medir viscosidad y densidad se hace necesario trabajar con cantidades más grandes de crudo, lo cual se realizó en el **experimento # 13**. Quedo demostrado que las bacterias utilizan la emulsión agua/petróleo como alimento, debido al crecimiento de las poblaciones de microorganismos. Otro problema que surge con el

experimento es que la emulsión se rompe en 24 horas, por el simple hecho de estar en movimiento otro factor que rompe la emulsión son los iones presentes en el medio líquido M9 que esta formado por varias sales, la ruptura de la emulsión disminuye el área de contacto entre el crudo y las bacterias, esto disminuye el posible efecto de las bacterias en el crudo. Para hacer más eficiente el proceso seria necesario crear una emulsión que fuese más resistente a la temperatura, al movimiento y también a los iones provenientes del medio salino. Una emulsión de residuo de vacío (**experimento # 3**) es más estable en estas condiciones de temperatura y movimiento de la incubadora, sin embargo tiene otras limitaciones a la hora de separar las bacterias de la emulsión, y también es más difícil que las bacterias se alimenten de compuestos con compuestos carbonados, que tienen enlaces más fuertes de romper.

2. Medidas de crecimiento poblaciones de las cepas de Mochima

A través del **experimento # 2** se pudo obtener valores fáciles de contar del crecimiento de las poblaciones de bacterias, y la identificación de los distintos fenotipos, ya que en los medios sólidos se observó como crecían las bacterias de manera separada por colonias.

ILUSTRACIÓN N° 27. Crecimiento Bacteriano En Una Cápsula De Petri



Es esta figura se observa el crecimiento de colonias de células, para una dilución de 10^8 , y se pueden contar visualmente 95 colonias de células entonces el titulo de colonias de células es de $9,5 \cdot 10^9$ por mililitro de medio.

3. Bacterias de Mochima sometidas a una emulsión de residuo de vacío del crudo Cerro Negro como única fuente de carbono y azufre.

Los experimentos realizados con residuos de vacío indican que las bacterias crecen utilizando a este como fuente de carbono y azufre, aunque de forma más difícil

ya que el conteo de población realizado en el experimento # 2 indica menores poblaciones comparado con el experimento # 1, existe la complicación en no saber las propiedades físicas en el residuo de vacío antes y después del tratamiento bacteriológico, ya que son difíciles de determinar.

4. Bacterias de Mochima sometidas a moléculas modelo como única fuente de azufre DBT, y única fuente de carbono AMN y Naftaleno.

Sirvió para evidenciar la presencia de azufre residual en el medio M9 y que este afectaba la desulfurización del DBT, y con respecto al naftaleno, AMN las bacterias de Mochima no crecieron en estos compuestos. Se hizo necesario un nuevo experimento para controlar la variable del azufre residual en el medio, como fueron los **experimentos # 10 y 11.**

5. Bacterias de Mochima sometidas a DBT como única fuente de azufre y Naftaleno como única fuente de carbono en medios sólidos agar.

Este experimento permitió visualizar el crecimiento de las bacterias en medios sólidos de naftaleno y DBT, dando como resultado que el crecimiento de las bacterias de Mochima es pobre en Naftaleno en este tipo de medio, este experimento fue llevado a cabo para las bacterias de Guanoco también, y dio como resultado que algunas de las cepas crecen muy bien en naftaleno.

6. Bacterias de Mochima sometidas a condiciones anaeróbicas en distintas fuentes de carbono y azufre.

En este proceso se sometieron las bacterias en condiciones anaeróbicas sirvió para demostrar que las bacterias Bm2 y Bm1, son facultativas, es decir, trabajan tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, esto se demostró con el crecimiento de las bacterias en un medio rico LB en condiciones anaeróbicas, además, se demostró son capaces de usar el KNO_3 como fuente de electrones. En los trabajos realizados con las moléculas modelo (AMN, DBT y Naftaleno), no se logró precisar si las bacterias crecen, ya que el experimento se llevó a cabo en tubos de ensayos, en los cuales el AMN y DBT se van hacia el fondo, permitiendo solo el crecimiento, si lo había alrededor de estos, lo cual hace difícil saber si hay crecimiento. Se propone trabajar las bacterias Bm1, Bm2 y Bm3, en condiciones anaerobias utilizando otra tecnología para ver posibles efectos sobre moléculas modelo.

7. Curva de crecimiento para una bacteria de Mochima sometidas a diferentes fuentes de carbono y azufre.

Este experimento # 7 de elaborar una curva de crecimiento en función del tiempo se realizó para la Bm1, dando como resultado que la bacteria Bm1, no crece para cada una de las moléculas modelos en función del tiempo. Este experimento se decidió llevar a cabo, para la Bm1, porque se observó un crecimiento de un orden de magnitud mayor a 10^8 , cuando la bacteria fue sometida a AMN/DBT, por esta razón se sospechaba que esta bacteria tendría un buen crecimiento en el tiempo, sin embargo este resultado no se pudo reproducir, hasta que se tomo un inóculo de un medio rico de LB y se colocó la bacteria sin lavar, lo cual origina un crecimiento que no significa que se este tomando el AMN/DBT como alimento sino que mas bien crecen con los restos que trae la bacteria adherido del LB.

8. Observación de cambios cualitativos en la densidad del crudo del experimento #1.

Permitió observar que para pequeñas cantidades de crudo, tratado bacteriológicamente es muy difícil saber, a través de una apreciación cualitativa si existen cambios en la densidad del crudo, ya que el crudo puede estar flotando debido a un arreglo molecular en la superficie entre el surfactante y el crudo, y a fuerza de tensión superficial, sin necesidad de que haya ocurrido un cambio de densidad en el crudo.

9. Mantenimiento de las bacterias en la nevera

Se conservan todos los microorganismos, en la nevera para ser utilizados cuando se requiere.

10. Starvation

Este experimento permitió verificar que existía un crecimiento residual de las bacterias solo con el azufre residual del medio M9, también sirvió para comparar este crecimiento con el crecimiento previo cuando se colocaba el DBT (experimento # 11), en los casos que la turbidez o la coloración del medio cambiaba se pudo saber si que había un crecimiento de las bacterias en DBT.

11 . Desulfurización del DBT o experimento de los 6 frasco se realizo para todas las cepas Mochima y Guanoco.

Este experimento en conjunto con el de Starvation es un logro a nivel de laboratorio ya que es una metodología que controla la desulfurización del DBT con bastante precisión, y toma en cuenta el efecto de posibles azufre residual en el medio.

Los resultados de la desulfurización del DBT a través de una serie de microorganismos se muestran en las siguientes tablas:

TABLA N° 7. Experimento de Desulfurización

Experimento de Desulfurización						
strain	0.1 mMSuccina	2mMSO4/10 mMsucc	10mMsucc	DBT/10nmS ucc	DBT	2mMSO4/D BT
G5aD	-	+++++	+	+++	-	+++ (amarillo)
G5c2A	+	+++++	++	+++	-	+++ (amarillo)
G5c2P	+	++	++	++	-	-
G5cD	-	+++++	++++	++	-	-
G5cG	-	+++++	-	++++	-	-
G5cP	-	+++++	-	+++	-	-
G6	-	+++++	-	-	-	-
G8b	+	++	++	++	-	-

TABLA N° 8. Experimento de Desulfurización

Experimento de Desulfurización						
strain	0.1 mMSuccinat	2mMSO4/10 mMsucc	10mMsucc	DBT/10nmSucc	DBT	2mMSO4/DBT
8B	+	+++++	-	-	-	-
CCAD1	-	+++++	+	++	-	-
CCO1	-	+++++	+	++	-	-
CCD2	+	+++++	+	+	-	-
CCD1	+	+++++	+	+	-	-
CCD3	+	+++++	+	+	-	-
5a1	+	+++++	++	++	+anaranjado	++
CCAD2	+	+++++	-	-	-	-
CCAD3	+	+++++	-	-	-	-
BM3	-	+++++	+	+	-	-
BM2A	-	+++++	+	+	++	+
BM2(B)	-	+++++	+	++	-	-
BM1(A)	+	+++++	+	+	-	-
BM1(B)	+	+++++	++	++	+	++
BM1(D)	+	+++++	+	+	-	-
BM1(C)						
U2	+	+++++	+	+	-	++
CA1	+	+++++	++	+	+	++

En la siguiente fotografía se pueden observar el experimento de los 6 fiolas

ILUSTRACIÓN N° 28. Experimento De Desulfurización Del DBT



Se observa las fiolas de la 1 a la 6 de izquierda a derecha las combinaciones en las tres fiolas de la derecha que tienen DBT se observa un color anaranjado característico de el ultimo compuesto HFBT de la ruta metabolica propuesta por Kodama para la acción bacteriológica . Además por haber un aumento en la turbidez del medio comparado

con el que solo tiene azufre residual, el DBT esta siendo desulfurizado y tomado como fuente de carbono.

12. Despertar de las células

Permitió tener cultivos frescos de todos los microorganismos con los que se trabajo, algunas veces al despertar un microorganismo de la nevera, se encuentra el microorganismo aislado con otros, esto sugiere que el microorganismo, no estaba realmente aislado ó que necesita de otra bacteria para sobrevivir. Estos cultivos fueron lavados y colocados en el crudo posteriormente o inducidos en moléculas modelo según el experimento.

13. Inducción de las bacterias en una molécula determinada

Se logro inducir las bacterias en las moléculas modelo naftaleno, algunas bacterias crecen mas rápido en este medio que otras, por lo general el tiempo que se tardan las bacterias que actúan sobre el naftaleno en alcanzar la fase exponencial de crecimiento es de 24 horas.

En la siguiente tabla muestra los resultados obtenidos al poner a crecer las bacterias del IDEA en Naftaleno, fenatreno, hexadecano, y ciclohexano.

TABLA N° 10. Crecimiento De Bacterias En Moléculas Modelo

MOLECULAS MODELO				
strain	M9+S04 NAPh	M9+S04+ Phenan	Hexadecano	Ciclohexano
8B		weak		-grumos rojos
CCAD1	-	weak		-grumos rojos
CCO1	weak	weak		-grumos rojos
CCD2	weak	-		-grumos rojos
CCD1	pos	weak		-grumos rojos
CCD3	-	-		
5a1	pos	pos		-
CCAD2	weak	weak		
CCAD3	-	weak		-
BM3	-	pos		-
BM2A	-	weak		-
BM2(B)	-	-		-
BM1(A)	weak	pos		
BM1(B)	weak	-		-
BM1(D)	-	-		-
BM1(C)	pos	-		-
U2	-	pos		
CA1	weak	weak		+grumos rojos
CA2	weak	pos	+	-
CORO	-	-		-
C1BMB	pos color marrón	pos		
C2BMB	???	pos		
G5aD	weak	weak		
G5c2A	weak	weak		
G5c2P	-	weak		
G5cD	-	weak		
G5cG	weak	weak	+++++	
G5cP	-	weak	+++++	
G6	-	-		
G8b	weak	-		

Si una bacteria crece en hexadecano con facilidad, esto causa un efecto negativo en el crudo por que disminuye el valor económico del mismo, ya que esta parte del crudo es muy importante cuando se obtiene la gasolina y esta directamente asociado con la capacidad de combustión del combustible. Por lo tanto, la bacteria queda descartada o si la bacteria tiene otras actividades importantes sobre el crudo, debe hacerse en ella una transformación genética, para que solo actúen la actividad deseada.

14. Tratamiento bacteriológico sobre emulsiones agua /petróleo.

El experimento #14 permitió hacer el tratamiento bacteriológico en cantidades de hasta 170 ml de emulsión petróleo agua, recuperándose 120 ml de crudo, lo cual permitió hacer medida de densidad con picnómetros , y viscosidad de Saybolt, ya que la cantidad puede ser una limitante para estas medidas. Experimentalmente se demostró que a medida que aumenta la relación agua / petróleo aumenta el crecimiento bacteriano. Así que la relación 20 /80 emulsión medio M9 fue donde se obtuvo un mejor crecimiento de los bacterias en general, esto se debe a que la mayoría de los microorganismos aislados son Pseudomonas las cuales tienen una membrana celular hidrofílicas. Por esta razón los experimentos de tratamiento bacteriológico en el crudo bajo condiciones de 70/30 petróleo/agua no presentaron cambios en la densidad del crudo, sin embargo al incrementar la cantidad de agua se pudieron ver cambios físico en el crudo tales como una disminución de densidad. Los cuales son difíciles de medir a medida que aumenta la cantidad de agua y disminuye la cantidad de crudo, sin embargo se sabe que el crudo Cerro Negro con una gravedad API de 8 no flota en agua destilada, al aplicar el procedimiento del **experimento #17** una vez transformado bacteriológicamente el crudo si flotó, dando evidencia de una densidad de por lo menos 10 API. Otro aspecto importante que se tiene que controlar es pH, medios con baja relación agua petróleo son alcalinos y es pobre el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por esta razón también es necesario disminuir la relación petróleo/agua en el medio para volverlo menos alcalino. Las medidas de densidad para las distintas relaciones agua petróleo se muestran en el **experimento # 20**.

15. Extracto celular

Se logro obtener extractos celulares, para ser utilizados en tratamientos bacteriológicos del crudo.

16. Tratamiento bacteriológico con extracto celular en una emulsión petróleo agua.

Dio como resultado cambios en la densidad del crudo, instantáneos al día siguiente ya se encontraba transformado el crudo, aunque no se a podido medir la densidad del crudo, existe evidencia del cambio de densidad en el crudo. A través del

uso de extractos celares se obtuvieron cambios de densidad e el crudo para relaciones petróleo /agua 67/33, 20/80.

En la siguiente figura se observa un cambio de densidad en un crudo Cerro Negro tratado con extracto celular de f618 a la izquierda, y un crudo Cerro Negro sin tratar a la derecha.

ILUSTRACIÓN N° 28. Muestras De Crudo Tratado Con Extracto Celular



En la siguiente foto se observa un crudo Cerro Negro tratado con extracto celular de un consorcio de bacterias Rizofera P1 (Guanoco) a la izquierda flotando en agua destilada, a la derecha vemos el control.

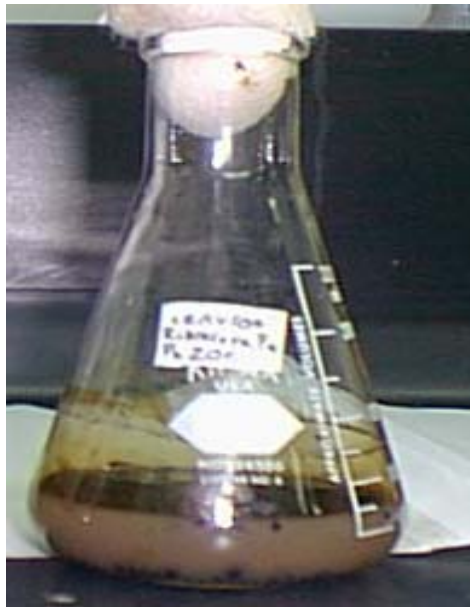
ILUSTRACIÓN N° 29. Muestras De Crudo Tratado Con Extracto Celular de Bacterias Rizofera P1



17. Separación de las fases después del tratamiento bacteriológico

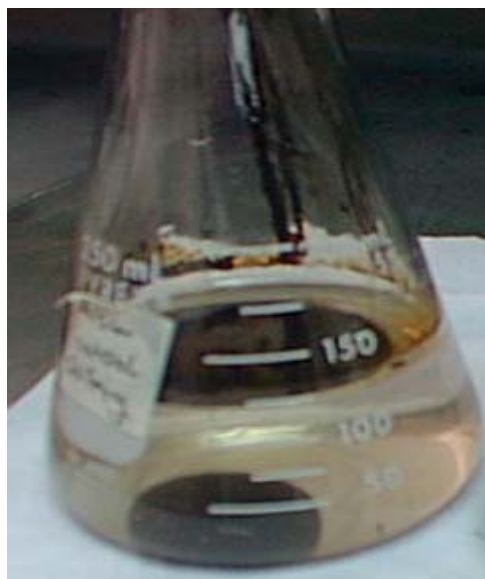
Esté experimento es muy importante ya que permitió separar las fases de petróleo medio líquido y biomasa después del experimento, así como también facilitó observar cambios de densidad cualitativos en el crudo como se muestra en la ilustración # 28 del crudo Cerro Negro tratado con extracto celular, el crudo está flotando en agua destilada, lo cual implica una densidad de al menos 10 API.

ILUSTRACIÓN N° 30. Medio Típico Después Del Tratamiento Bacteriológico



La figura muestra el medio típico después del tratamiento bacteriológico, se observa la mezcla de varias fases y la ruptura de la emulsión.

ILUSTRACIÓN N° 31. Muestra de Crudo en Agua Destilada, después de separar las Fases.



En la siguiente tabla se encuentran los resultados de una observación comportamiento del crudo en agua destilada una vez separadas las fases de

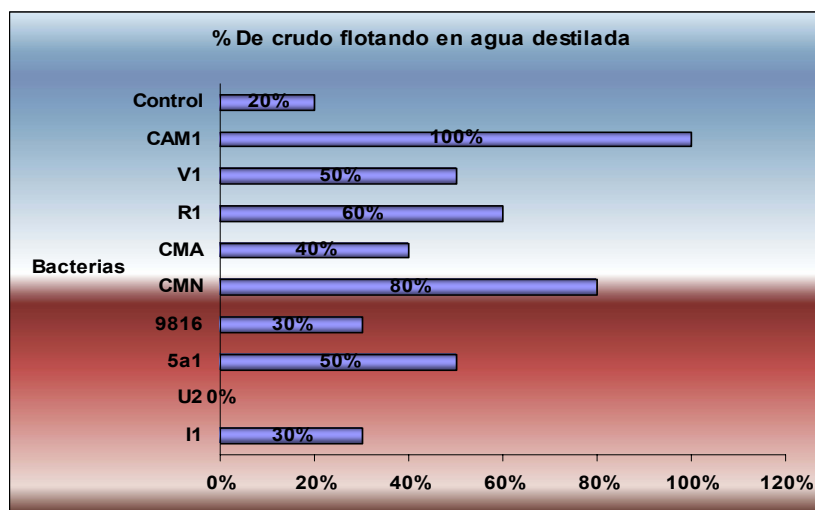
TABLA N° 10. Cambios cualitativos Observados en la Densidad cuando se coloca El Crudo Tratado

En Agua Destilada .

Agua/Petróleo 80/20			
Todas las cepas inducidas en naftaleno			
Muestra	ph	% arriba	% abajo
I1	7	30%	70
U2	7	0%	100
5a1	7	50%	50
9816	7	30%	70
CMN	7	80%	20
CMA	7	40%	60
R1	7	60%	40
V1	7	50%	50
Control	7	20%	80%
CAM1	7	100%	0

Esta tabla muestra un cambio de densidad para CA1, ya que 100% del crudo tratado bacteriológicamente se encuentra flotando en la superficie y si se compara con el control en el cual solo el 20% del crudo se encuentra flotando en la superficie y el 80% se encuentra en el fondo.

ILUSTRACIÓN N° 31. Porcentaje del crudo flotando en agua destilada



En la siguiente foto se observa un cambio de densidad en el crudo una vez separadas las fases y puesto el crudo en agua destilada,, el control esta a la izquierda y el crudo tratado con la bacteria CA1 se ubica a la derecha

ILUSTRACIÓN N° 32. Muestra Tratada Y Muestra Control



18. Tratamiento bacteriológico para una gota de crudo Cerro Negro

Se trató bacteriológicamente, y con extractos celulares a una gota de crudo Cerro Negro, la gota de crudo siempre se encontraba en el fondo del medio líquido, lo cual sugiere que no se presentó una disminución de densidad menor a la del medio líquido en que se encontraba sumergida; Los cambios en la morfología de la gota y variaciones en la densidad fueron medidos con el experimento # 19, se demuestra que la densidad de la gota había disminuido aunque no se alcanzará la densidad del agua ,ya que no flotaba en agua destilada.

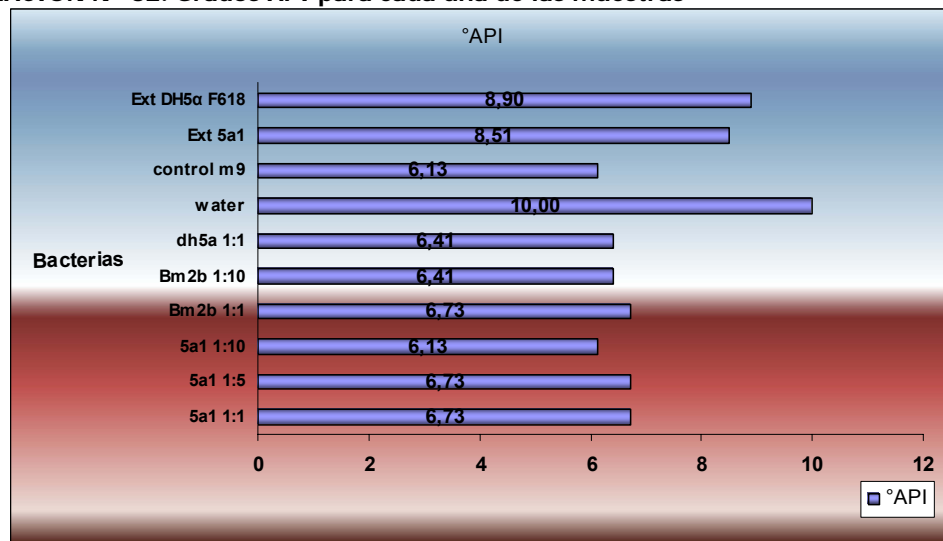
19. Medida de densidad de una gota de petróleo de crudo Cerro Negro

Se midió la densidad de la gota de crudo Cerro Negro tratada bacteriológicamente y por extractos celulares, dando los siguientes resultados

TABLA N° 11. Resultados Obtenidos Mediante El Tratamiento Bacteriológico

MUESTRAS	°API
5a1 1:1	6,73
5a1 1:5	6,73
5a1 1:10	6,13
Bm2b 1:1	6,73
Bm2b 1:10	6,41
dh5a 1:1	6,41
agua	10,00
control m9	6,13
Ext 5a1	8,51
Ext dh5 f618	8,90

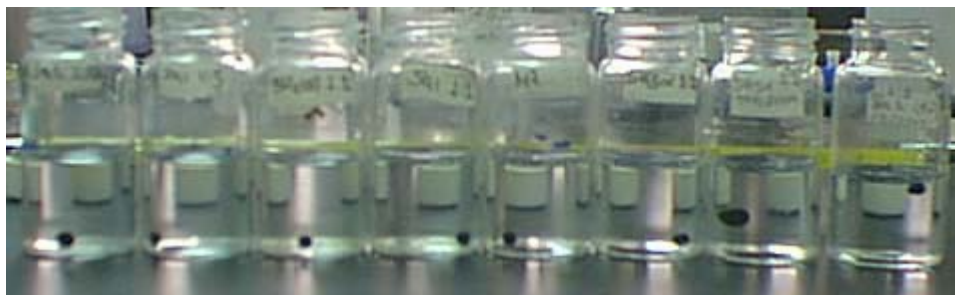
ILUSTRACIÓN N° 32. Grados API para cada una de las muestras



Se puede observar que lagota tratada con extracto celular sufrio in cambio de 2,7 API con respecto al control.

Fotografía de la situación física cuando se le agrega la misma cantidad de solución salina, en agua destilada con gotas de petróleo tratadas con diferentes microorganismos, podemos observar en la foto como la gota con menor densidad flota primero que las demás.

ILUSTRACIÓN N° 33. Muestras de crudo tratado por bacterias en agua destilada



5a1 Control

Ext 5a1 EXT dh5 f618

El experimento de densidad llevado acabo con el método de la bolita mostró como resultados cambios de densidad de 2,7 API, este experimento se realizó directamente sobre el crudo Cerro Negro y con una proporción de agua grande con respecto ala gota de crudo.

20. Medida de densidad del crudo recuperado de la emulsión tratada

Se logro medir la densidad del crudo Cerro Negro y los valores se ve en las siguientes tablas

TABLA N° 12. Medidas De Densidad De Los Crudas Tratados, Con Una Relación Petróleo/Agua de 62/38

Medidas de Densidad de Crudos Tratados	
Muestras	API
control químico	7,84
I1	7,21
5a1	7,76
u2	7,69
9816	7,54
Cerro Negro	8,46
Petróleo/ agua 62/38	

TABLA N° 13. Medidas De Densidad De Los Crudas Tratados, Con Una Relación Petróleo/Agua de 50/50

Muestra	API
I1	7,78
CA	8,06
9816	8,05
Control Quimico	7,6
oil/water	50/50

Para la relación 62/38 petróleo /agua se percibe que no hay cambio de densidad en el crudo tratado bacteriológicamente con este grupo de bacterias , al igual que para la relación 50/50 tampoco se notan cambios en la gravedad API para otro grupo de microorganismos. Lo que demuestra que la relación petróleo/agua juega un papel importante en el actividad bacteriológica sobre el crudo. No se pudo medir la densidad del crudo para la relación 20/80, ya que al aumentar la cantidad de agua es necesario disminuir la cantidad de petróleo, por que es difícil manejar cantidades mayores de 300 ml de medio total en el laboratorio. Además al aumentar las cantidades de medio, se debe utilizar recipientes grandes de modo que factores como la oxigenación de las bacterias no afecten el proceso.

21. Medidas de viscosidad.

Al igual que el experimento anterior las medidas de viscosidad que se lograron realizar son para la relación 62/38 y en la siguiente tabla no se muestran cambios significativos de viscosidad, en el crudo tratado bacteriológicamente.

TABLA N° 14. Medidas De Viscosidad

Viscosímetro de Saybot	
Muestras	Viscosidad(a 98C)cst
5a1	421,88
Control químico	405,6
Control extracto	420,6
Cerro Negro	381,81

22. Medida de las fracciones presentes en el crudo (SARA) por HPLC

Los análisis SARA mostraron que no hay cambios significativos en las fracciones del crudo a relaciones petróleo/agua de 62/38, para este grupo de microorganismos, al comparar los valores de las fracciones del crudo con el control. En la siguiente tabla vemos una pequeña disminución del contenido de asfaltenos en los crudos tratados bacteriológicamente comparado con el control que se puede atribuir a un error de medición o aún pequeño cambio en las fracciones del crudo.

TABLA N° 15. Análisis Sara Del Petróleo Extraído De La Orimulsión

Análisis SARA de petróleo extraído de la orimulsión				
Muestra	Promedios			
	% Saturado (+/-1)	% Aromatico (+/-1)	% Resinas*	% Asfaltenos (+/-0,5)
control	13,1	31,4	46	9,3
BM2b	13,2	32,6	46	8,3
5a1	13,6	30,5	48	8,2
siete 2	13,8	30,2	48	8,4
control extracto	13,6	28,4	49	8,6
DH5 f6	12,6	27,2	52	8,5

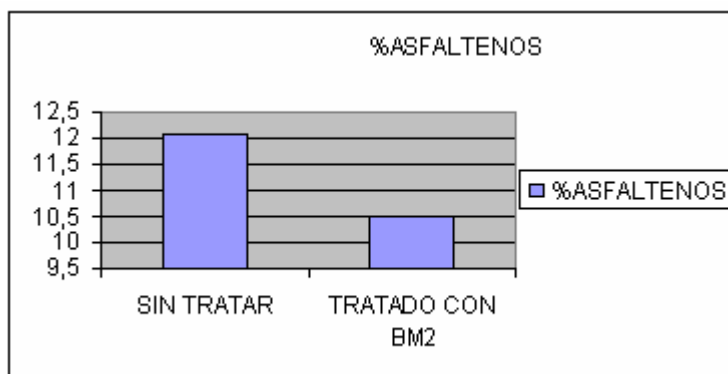
TABLA N° 16. Análisis Sara Del Petróleo Extraído De La Emulsión Petróleo/Agua 50/50

Resultados Analisis Sara # 2 Bacterias Inducidas				
Muestra	% Saturado(+/- 1)	% Aromatico(+/-1)	% Resinas*	% Asfaltenos(+/-0,5)
5a1	14	26	50	10,7
5a1extracto	12	25	51	11,6
9816	15	24	51	10,5
control quimico	14	24	52	11
u2	13	24	52	10,3
l extracto	15	27	44	11,7
DH5	16	25	41	10

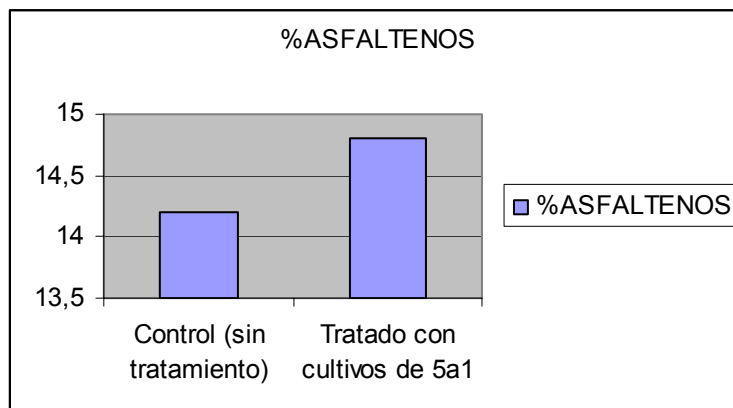
23. Medida del % de asfaltenos

Experimento de % de asfaltenos en el crudo mostró los siguientes resultados.

ILUSTRACIÓN N° 34. Del Porcentaje De Asfaltenos Del Crudo Tratado con BM2 Y Sin Tratar



Se observa una disminución en el contenido de asfaltenos de 1,5% en el crudo tratado bacteriológicamente comparado con el control.

ILUSTRACIÓN N° 35. Del Porcentaje De Asfáltenos Del Crudo Tratado con 5^a1 Y Sin Tratar

En el siguiente grafico se aprecia un incremento pequeño en el contenido de asfaltenos del crudo tratado con respecto al control de crudo Cerro Negro, ambos valores de asfáltenos son un poco altos para el valor del contenido del crudo de Cerro Negro que es 10% aproximadamente, esto sugiere que esta técnica es imprecisa, una explicación para del pequeño aumento del contenido de asfaltenos puede ser la adición de restos de biomasa a los asfáltenos.

24. Aislamiento de cepas bacterianas del lago de asfalto de Guanoco (Edo. Sucre Venezuela). 2do viaje a Guanoco

Se lograron aislar de las muestras que provienen del Lago de asfalto más grande del mundo (Guanaco) mas de 80 microorganismos con la capacidad de utilizar el petróleo como fuente de carbono .Todos estos microorganismos son una fuente potencial de estudio para la conversión de los crudos pesados.

CONCLUSIONES

En el crudo Cerro Negro:

- Se lograron cambios positivos en la propiedad de los crudos pesados de densidad, aunque no es fácil la reproducción del experimento.
- En crudos tratados con extracto celular se logro un cambio de densidad de 8 a 10 API en menos de 24 horas, en crudos tratados con bacterias aisladas se observo un cambio de igual magnitud en 5 días, y con consorcios de bacterias también se obtuvieron cambios de densidad de por lo menos 2 API.
- Estos resultados muestran que se lograron cambios en la densidad de por lo menos 2 API, no se han podido tener de manera cuantitativa la medida del cambio sin embargo tenemos evidencia física del evento.
- Se logro que flotara en agua cantidades desde 10 ml hasta 100 ml de crudo Cerro Negro lo que indica una gravedad API de al menos 10 API, crudo que antes del tratamiento tiene una gravedad de 8 API, es decir que no flota en agua.
- Quedo demostrado que con un grupo seleccionado de bacterias con una actividad especifica sobre el crudo, se logran cambios positivos de densidad en el crudo, lo cual es un paso hacia el desarrollo tecnológico de los crudos pesados de la faja petrolífera del Orinoco de Venezuela.
- Los experimentos llevados a cabo demuestran que los crudos pesados pueden ser modificados de manera positiva por bacterias, mejorando propiedades como la densidad.
- Se encontró que la mejor forma de crecimiento para este grupo de bacterias en el petróleo son las siguientes condiciones PH7, 30°C, una relación petróleo agua de 20 / 80, 200 rpm para la oxigenación del medio.

En las moléculas modelo:

- Se demostró la actividad de desulfurización por bacterias de compuestos tales como el dibenzotiofeno. También se aislaron bacterias que mineralizan completamente el naftaleno, compuestos representativos el primero de los compuestos azufrados del petróleo y

el segundo un compuesto aromático con una estructura similar a la mayoría de los compuestos presentes en el petróleo. Y otras bacterias que son capaces de realizar varias de estas funciones al mismo tiempo.

En el aislamiento:

- La cantidad de cepas aisladas con actividad en el crudo es de más de 80, provenientes del suelo de Guanaco, el fondo marino de Mochima y del suelo de Sarteneja. Este grupo de bacterias tienen la capacidad de crecer en presencia de petróleo pesado, utilizando al mismo en unos casos como fuente de carbono y azufre, y en otros solo como fuente de carbono.

En la investigación científica:

- Desde el punto de vista metodológico, se desarrolló un experimento eficiente para medir la capacidad de desulfurización de las bacterias en moléculas modelo de DBT, en medios con azufre residual. También se logró desarrollar un experimento que mide los cambios de densidad en una gota de crudo Cerro Negro tratado bacteriológicamente.
- El presente trabajo sirve como una propuesta de los experimentos que se pueden plantear en el estudio del mejoramiento de los crudos pesados a través de actividad bacteriológica, ya que en Venezuela no se ha profundizado en esta área en la actualidad.

En lo Económico:

- Por ser este un proceso que es llevado a cabo a temperatura y presión ambiental, y de fácil adaptabilidad a las instalaciones de campo, producción o refinamiento, estas características podrían convertir a este proceso biotecnológico, en un futuro en una forma económica y productiva de transformar los crudos pesados.

RECOMENDACIONES

Para mejorar el proceso

- Crear una emulsión que sea más resistente a la temperatura, al movimiento y también a los iones provenientes del medio salino.
- Profundizar en el estudio de los cambios de las propiedades físico químicas del crudo tratado por microorganismos.
- Continuar la caracterización en moléculas modelo de todos los microorganismos aislado.
- Probar las bacterias con la capacidad de desulfurizar, abrir los anillos y mineralizar el DBT, en el crudo y realizar análisis de azufre de los crudos tratados.
- Buscar contribución tanto de capital humano como económico.

A un futuro próximo:

- Optimizar el proceso por diferentes vías, una opción es crear una bacteria genéticamente transformada, que contenga actividades específicas sobre el crudo.
- Profundizar en el estudio enzimático de las bacterias que actúan sobre el crudo.
- Desarrollar un modelo tipo escala con la capacidad de transformar por lo menos 20 galones de crudo Cerro Negro.
- Tener como meta alcanzar por lo menos un valor de 15 API con el proceso biotecnológico, para que el crudo fluya a través de las tuberías sin necesidad de usar diluyente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ian M. (2004) "Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil" review.
2. Hunt , J. (1979). Petroleum Geochemistry And Geology. Freeman, San Francisco
3. Roadifer, R. (1987). In Exploration For Heavy Crude Oil And Natural Bitumen (Edit Meyer R.,F.) America Association Petroleum Geological. Tulsa. 3-23.
4. Demaison, G. (1977) Tar Sand And Supergiant Oil Fields. America Association Petroleum Geological. 61
5. Creaney, S & Allan, J. (1990). In Classic Petroleum Provinces. (Ed. Brooks). Geological Society. 189-202.
6. United States Geological Survey World Oil Assesment. (2000).
7. Kamp, A. et al. (2001) Experimental Investigation Of Foamy Oil Solution Gas Drive, SPE 69725.
8. Espinoza, C; Pereira, P; Guimerans, R; Gurfinkel, C. (2001). Production And Refining Of Heavy Crude: A Business Opportunity In Venezuela. PDVSA-INTEVEP, Venezuela.
9. León, V. 1998"Nuevos enfoques sobre la visión molecular de un crudo pesado"Visión Tecnológica. 5(2):131-138
10. Wiehe; I. (1994) The Pendant-Core Building Block Model Of Petroleum Residua. Energy & Fuels,8(3):536-544.
11. Izquierdo, A., Carbognani,L; Mendez, A. (1991). "Characteristic of bitumens, heavy crudes and vacuum residua" A review. Proc. UNITAR V int. conf.on Heavy Crudes & Tar Sands . V1: 65-84.
12. Murgich, J.; Rodríguez, J.; Aray, Y (1996). Molecular Recognition And Molecular Mechanics Of Micelles Of Some Model Asphalthenes And Resins. Energy & Fuels, 10(1): 68-76.
13. Sheu, E. (1996). Physic Of Asphalthenes Micelles Microembrions- Theory And Exoeriment. J . Phys. Condens. Matter, 8: A125-A14.
14. León, V . 2000. " Composición Y Estructura De Un Crudo Pesado " Revista Conicit. 2(1):37-46
15. Pedro Pereira, Roger Marzin, PDVSA-Intevep Michael McGrath, Foster Wheeler Gregory J. Thompson, UOP LLC" How To Extend Existing Heavy Oil Resources The Aquaconversion Technology" World Energy Coucil.

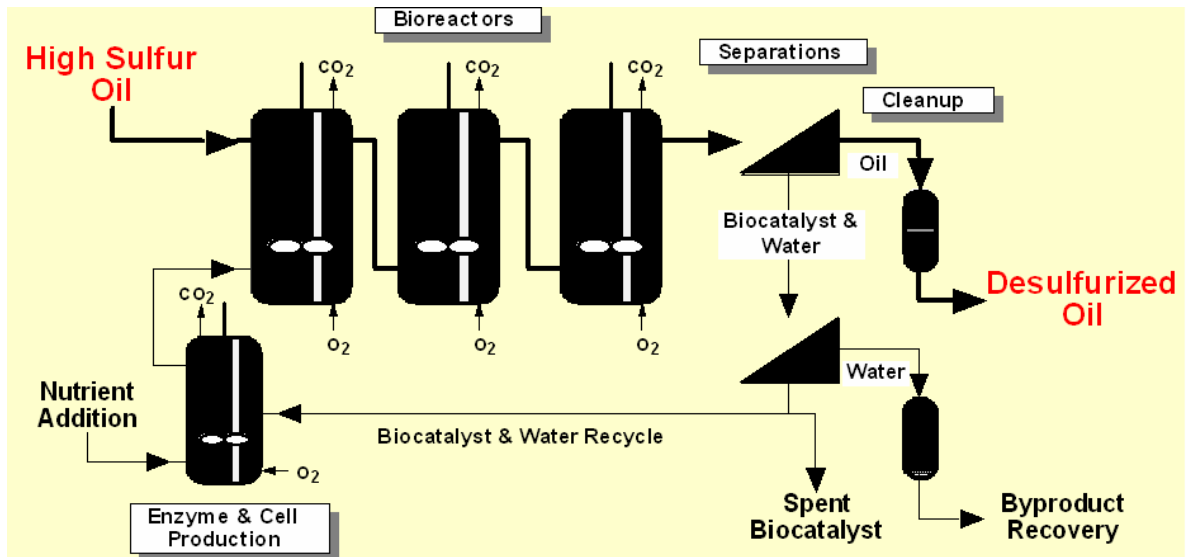
16. "Estudio del mejoramiento de moléculas modelo presentes en los crudos pesado asistidos por ultrasonido" tesis. UCV Caracas.
17. "Delaying Coking" ABB Lummus Global
19. Garcia, D. "Emulsiones de agua-petróleo"(tesis).UCV Caracas
20. "Aqua conversion the process". (2001). Refining.
21. "Biotecnología" www.petrobras.com.
22. Trebbau G., Partidas C., Caira R. (2001). Microbial Stimulation Of Havy Oil Producing Wells "Micro Bac De Venezuela, PDVSA Technology. First international Conference on petroleum biotechnology. 141-144.
23. Takashi O., Yosshikazu I. (1999). "Microbial Desulfurización Of Organic Sulfur Compounds In Petroleum@ Biotechnol. 63(1): 1-9
24. Grossman, M; lee. (1999). Microbial Desulfurization Of A Crude Oil Middle-Destillte Fraction: Analysis Of The Extent Of Sulfur Removal And The Effect Of Removal On Remaining Sulfur. American Society For Microbiology. 65 (1): 100-112.
25. Denome, S; Oldfield, C; Nash L; Yaung K. Characterization Of The Desulfurization Genes From Rhodococcus Sp. Strain IGT28. Department Of Microbiology And Immunology. University Of North Dakota School Of Medicine, Grand Forks, 58202
26. Sung, K; Je Hwan, Chang; Young, K; Nam, Chang. (1998) Desulfurization Of Dobenzothiophene And Diesel Oils By A Newly Isolated Gordona Strain CYKMS1. Bioprocess Engineering Research Center And Department Of Chemical Engineering, Kusing-Dong, Taejon Korea 305-375.
27. Premuzic E.T" Biochemical conversion of heavy crude oils" Energy Science and Technology Division, Department of Applied Science, Broohaven National Laboratory. Firs international conference on petroleum biotechnology. 75-79.
28. Conan, J. (1984). In Advances In Petroleum Geochemistry. (Edit. Brooks, J & Wellte, D). Academia, London. Vol. 1. 299-335.
29. Volkman, J; Jobson, A (1984). Biodegradation Of Aromatic Hydrocarbons In Crude Oils From The Barrow Sub-Basin Of Western Australia. Organization Of Geochemimistry. Vol. 6 619-632
30. Rowland, S; Alexander, R; Kagi, R; Rowland, S. (1986). Microbial Degradation Of Aromatic Components Of Crude Oils: A Comparisons Of Laboratory And Field Observations. Organization of geochemimistry. 9 153-161.
33. Lehninger, A (1982). "Principles Of Biochemistry". Edith Worth Publischers. USA.
34. León, V ."Vialidad del uso de las enzimas en procesos de la industria petrolera" Nota técnica.

35. IMP.(2002). "Biotecnología del petróleo. [www.imp.biotecnologia](http://www.imp.biotecnologia.delpetroleo.hmt)delpetroleo.hmt
36. Fedorak P., Weslake, D. (1984). Microbial Degradation Of Alkyl Carbazoles In Norman Wells Crude Oils Appl. Environ. Microbiol.47, 858-862.
37. Montichello D. (2004), "Patend of biodezulfuration" curso de biotecnología en el petróleo.
38. Foght J. (2004)"catabolism of aromatics" curso de biotecnología en el petroleo".

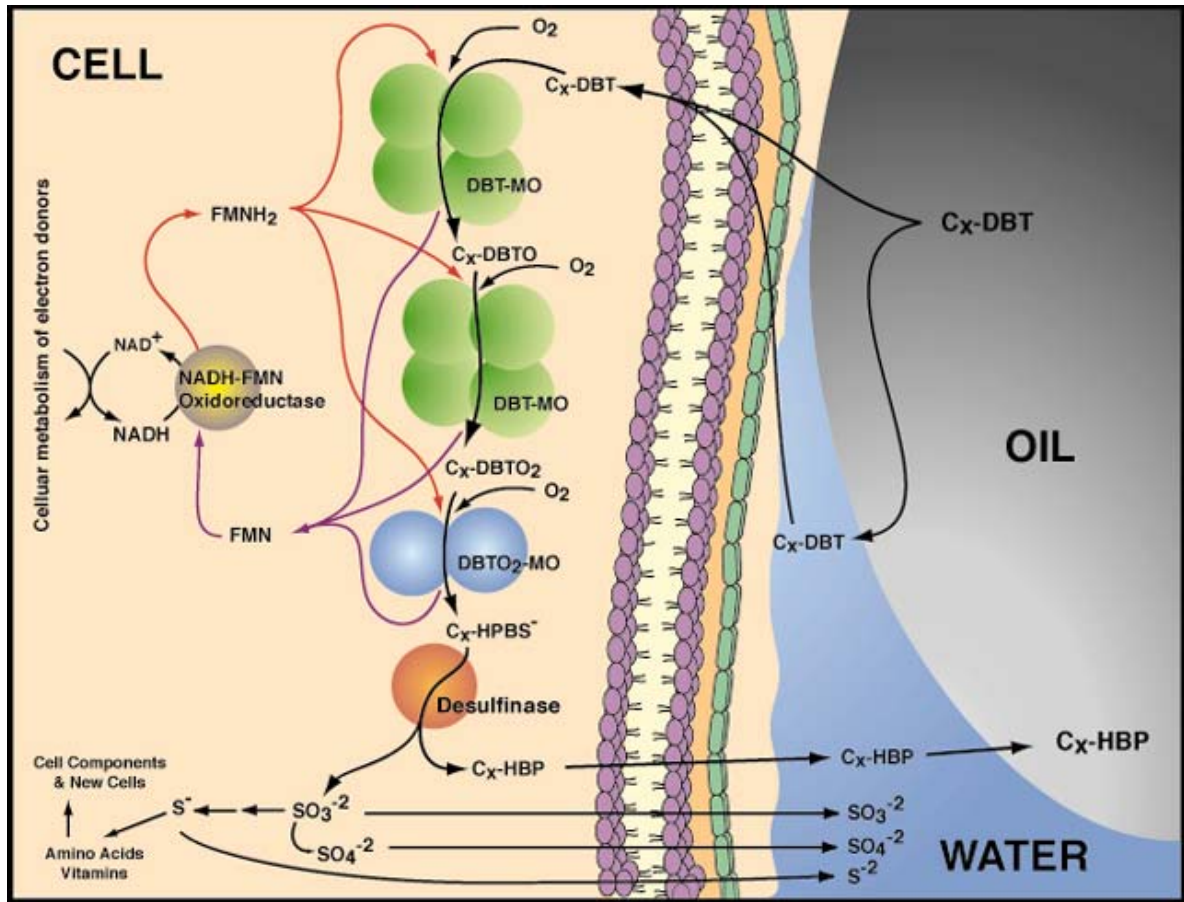
GLOSARIO

- **Aminoácidos:** Compuesto químico orgánico que tiene al mismo tiempo carácter de ácido y de amino, son los componentes básicos de las proteínas. Existen veinte aminoácidos que constituyen el alfabeto de la estructura de las proteínas y determinan muchas las propiedades de las mismas.
- **Bacteria:** Son células prokariotas son probablemente las primera células en la evolución biológica que no poseen un núcleo definido, son muy simples y pequeñas, no tienen una membrana alrededor del núcleo sino una membrana celular, no posee organelos como mitocondrias o retículos endoplasmáticos (Lehninger A, 1970).
- **Biodegradación:** Degradación o descomposición natural de una sustancia por acción de agentes biológicos.
- **Biotecnología:** Es una rama del conocimiento que utiliza las actividades de los seres vivos para transformar materias primas en productos de mayor valor agregado, o bien en la generación de procesos que consumen menos energía, son más limpios y tienen carácter sustentable.
- **Biodesulfurización:** es la eliminación selectiva de azufre de compuestos orgánicos sulfurados, sin la eliminación de los átomos de carbono.
- **Biorremediación:** Es la completa mineralización de un compuesto orgánico sulfuroso. Todos los enlaces son rotos. CO_2 , H_2O , SO_4^- son los productos finales y se reduce la toxicidad.
- **Crecimiento:** se define como el aumento ordenado de todos los componentes bioquímicos de un organismo. En bacterias el resultado mas obvio del crecimiento es el aumento en el número de células, su multiplicación.
- **Cometabolismo:** La transformación de compuestos orgánicos por microorganismos es un compuesto más simple que no puede ser usado como fuente de energía o nutriente por estos.
- **Catabolismo:** es el proceso bioquímico que envuelve transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos en compuestos más simples, usualmente dirigidos a la producción de energía.

- **Desulfurización:** Eliminación del sulfuro de un compuesto a través de una reacción química o biológica.
- **Desmetalización:** Remoción de partículas de metal de un compuesto orgánico o inorgánico.
- **Densidad:** Es la relación entre la masa y volumen de un cuerpo.
- **Enzima:** Es una clase especializada de proteína, ellas son el instrumento primario en la expresión de la acción de los genes, ya que ellas catalizan miles de reacciones químicas, las cuales constituyen los metabolismos intermediarios de las células.
- **Mineralización:** es cuando se transforman los compuestos orgánicos en compuestos mas simples inorgánico o iones tales como CO_2 , H_2O , SO_4^- .
- **Orimulsión:** Es una emulsión de aceite y agua en la cual el agua es fase continua y el aceite es la fase dispersa, además ellas están unidas por un surfactante, que tiene como función un aumento de la tensión interfacial entre el agua y el aceite, para estabilizar las gotas de petróleo en el agua.
- **Proteína:** Están hechas por uno o más enlaces polipéptidos, los cuales tienen cien o más aminoácidos junto enlaces pépticos. Todas proteínas no importa su función, especie u origen son construidas a partir de un conjunto básico de 20 aminoácidos arreglados en varias secuencias específicas (Lehninger A, 1970). Entre sus diversas funciones están, las de catalizadores (las enzimas), elementos estructurales, como vehículos de transporte como hormonas (la hemoglobina, en la sangre), agentes protectores (los anticuerpos).
- **Viscosidad:** Es la resistencia a fluir de un fluido, debido a características moleculares del fluido, tales como, la fricción y las fuerzas de atracción de las moléculas, las cuales crean una resistencia al movimiento.

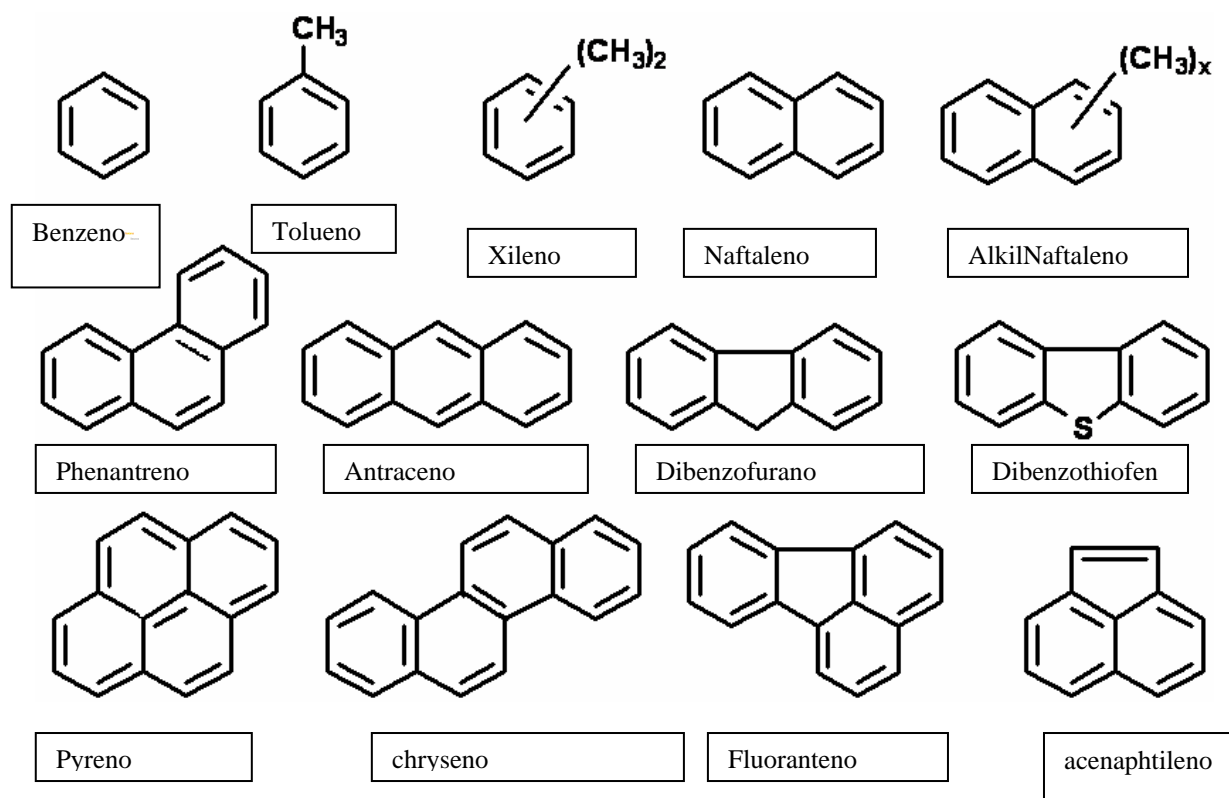


En la figura anterior observamos un modelo propuestos para un proceso de biodesulfurización

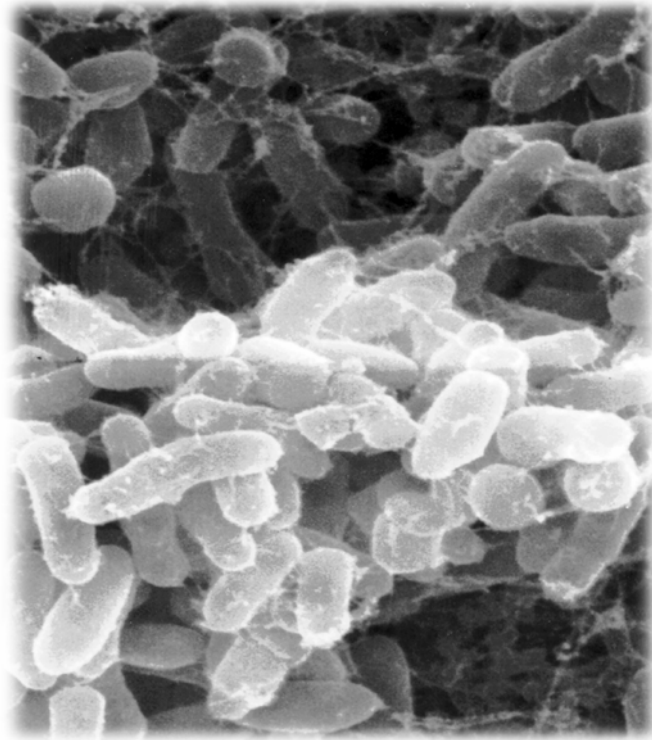


En se observa una representación de cómo las células transforman las moléculas del petróleo.

Estructuras aromáticas presentes en el crudo



Rhodococcus Erythropolis IGTS8



Bacteria que desulfuriza el petróleo sin degradar el hidrocarburo