

Potencialidades de bacterias aisladas de crudo en la recuperación mejorada de petróleos pesados

Thais Hernández Gómez¹, Lisset Miquel González² y Freya González Núñez³.

¹ *Licenciada en Microbiología. Máster en Negocio de Petróleo y Gas. Centro de Investigación del Petróleo. La Habana, Cuba. Correo electrónico: thaishg89@gmail.com.*

² *Ingeniera en Tecnologías Nucleares y Energéticas. Máster en Negocio de Petróleo y Gas. Centro de Investigación del Petróleo. La Habana, Cuba. Correo electrónico: lisset@ceinpet.cupet.cu.*

³ *Licenciada en Química. Centro de Investigación del Petróleo. La Habana, Cuba. Correo electrónico: freya@ceinpet.cupet.cu.*

RESUMEN

De los problemas de mayor incidencia que afectan a la industria petrolera se señala la baja eficiencia de extracción de hidrocarburos de sus reservorios naturales. Los métodos que incluyen microorganismos para aumentar los índices de recuperación se presentan como una alternativa ecológica y económicamente sustentable. Esta investigación tiene como objetivo evaluar las potencialidades de seis cepas bacterianas, aisladas de un pozo de la Franja Norte Petrolera Cubana, para el proceso de recuperación de petróleo. Se valoró la capacidad de las cepas para adherirse y formar biopelículas sobre la superficie de fragmentos de tres núcleos de pozos de distintos yacimientos, mediante microscopía electrónica y espectrometría de rayos X. La colonización bacteriana de las superficies rocosas en estudio se demostró tanto en las carbonatadas como las arcillosas, evidenciándose la adhesión a distintos minerales. Se aplicó la resonancia paramagnética electrónica a una de las muestras de rocas limpias, así como a los hidrocarburos extraídos de la misma, encontrándose el mismo radical libre correspondiente a materia orgánica. Al hidrocarburo extraído también se le realizó espectrometría de resonancia magnética nu-

clear para definir la composición química y cuantificación de las fracciones del crudo. Se obtuvo un factor de aromaticidad de 0.306 y un predominio de los carbonos secundarios, terciarios y cuaternarios, comprobando el carácter pesado del crudo. Dichos resultados alcanzan notable significación al diseñarse procesos de recuperación mejorada con microorganismos, ya que no se limita su aplicación a un tipo específico de yacimiento. Además, se demostró que las cepas bacterianas tienen la capacidad de desplazar petróleo pesado entrampado en la matriz. Actualmente continúan los estudios de laboratorio para realizar un diseño de recuperación de petróleo con el empleo de microorganismos que se adecúen a las condiciones de los yacimientos cubanos.

Palabras clave: recuperación mejorada de petróleo con microorganismos, biopelículas, caracterización de petróleo, resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética nuclear.

ABSTRACT

Of the problems of greater incidence that affect the petroleum industry it is indicated the low efficiency of

extraction of hydrocarbons of its natural reservoirs. Methods that include microorganisms to increase recovery rates (MEOR) are presented as an ecologically and economically sustainable alternative. The objective of this work is to evaluate the potential of 6 bacterial strains, isolated from a well in the North of Cuba, for the process of oil recovery. The ability of the strains to adhere and form biofilms on the surface of 3-core fragments from different wells was evaluated by electron microscopy and X-ray spectrometry. The bacterial colonization of the rocky surfaces under study was demonstrated in both the carbonated like clayey ones, evidencing the adhesion to different minerals. The Electronic Paramagnetic Resonance was applied to one of the samples of clean rocks, as well as to the hydrocarbons extracted from it, finding the same free radical corresponding to organic matter. The extracted hydrocarbon was also subjected to Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry to define the chemical composition and quantification of crude fractions. An aromaticity factor of 0.306 and a predominance of secondary, tertiary and quaternary carbons were obtained, demonstrating the heavy character of the crude. These results reach significant significance when designing MEOR processes since their application is not limited to a specific type of deposit. In addition, it was shown that the bacterial consortium has the ability to displace heavy oil trapped in the matrix. Laboratory studies are currently underway to design a MEOR that is adapted to the conditions of the Cuban deposits.

Keywords: improved oil recovery with microorganisms, biofilms, petroleum characterization, nuclear magnetic resonance, nuclear paramagnetic resonance.

RESUMO

Dos problemas de maior incidência que afetam à indústria de petróleo é indicada a baixa eficiência de extração de hidrocarbonetos de seus reservatórios naturais. Métodos que incluem microrganismos para aumentar as taxas de recuperação (MEOR) são apresentados como uma alternativa ecologicamente e economicamente sustentável. O objetivo deste trabalho é

avaliar o potencial de 6 cepas bacterianas, isoladas de um poço do norte de Cuba, para o processo de recuperação de óleo. A capacidade estirpes de aderir e formar biofilmes na superfície de fragmentos de três núcleos bem a partir de diferentes locais, por microscopia de elétrons e de raios-X espectrometria de colonização bacteriana do estudo superfícies rochosas mostraram ambos carbonada avaliada como os argilosos, evidenciando a adesão a diferentes minerais. A Ressonância Paramagnética Eletrônica foi aplicada a uma das amostras de rochas limpas, bem como aos hidrocarbonetos extraídos, encontrando o mesmo radical livre correspondente à matéria orgânica. O hidrocarboneto extraído também foi submetido à Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear para definição da composição química e quantificação das frações brutas. Um fator de aromaticidade de 0.306 e uma predominância de carbonos secundários, terciários e quaternários foram obtidos, demonstrando o caráter pesado do petróleo bruto. Esses resultados alcançam significância significativa ao projetar processos MEOR, uma vez que sua aplicação não está limitada a um tipo específico de depósito. Além disso, foi demonstrado que o consórcio bacteriano tem a capacidade de deslocar o óleo pesado retido na matriz. Estudos laboratoriais estão em andamento para projetar uma MEOR adaptada às condições dos depósitos cubanos.

Palavras-chave: melhor recuperação de óleo com microrganismos, biofilmes, caracterização de petróleo, ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética nuclear.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza de los reservorios carbonatados fracturados y las características físico-químicas de los crudos pesados implican un bajo factor de recuperación (Zhang y Xiang, 2010). La mayoría del petróleo residual se encuentra en microtrampas por causa de las fuerzas capilares, adherido a la superficie mineral o desviado dentro de la formación rocosa (Kohr, 2012). El uso de microorganismos como herramienta en la recuperación mejorada de petróleo (MEOR, según sus

siglas del inglés *Microbial Enhanced Oil Recovery*), se convirtió en una alternativa atractiva y económicamente factible. Las metodologías MEOR se refieren al uso de bacterias y/o *archae* y sus productos metabólicos (ácidos, gases, biopolímeros, biotensoactivos y otros), para aumentar la recuperación de hidrocarburos en yacimientos candidatos al proceso (Al-Sulaimani *et al.*, 2011).

Ante condiciones adversas del ambiente los microorganismos tienden a agruparse, formando comunidades que se encuentran adheridas a una superficie orgánica o inorgánica. A este tipo de crecimiento se le denomina biopelícula. Las mismas son de aspecto mucoso por causa de la liberación de un material extracelular, de origen polimérico (Madigan *et al.*, 2014). En distintas ramas de la industria se han analizado los efectos perjudiciales o favorables de las biopelículas, pero en la industria petrolera estas son poco estudiadas, específicamente aplicadas a los procesos de MEOR.

En un trabajo previo se realizó un aislamiento de seis bacterias a partir de petróleo crudo muestreado en la Franja Norte Petrolera Cubana. Los microorganismos se caracterizaron e identificaron por métodos convencionales y moleculares. Además, se determinó la capacidad de producción de biosurfactantes de las mismas, demostrándose sus potencialidades para procesos de MEOR (Hernández, 2018). El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de generación de biopelículas y verificar su formación sobre la superficie de diferentes núcleos de pozos de petróleo. Para ello se utilizaron tres muestras de rocas pertenecientes a la capa productora de tres yacimientos de la Franja Norte Petrolera Cubana. Dichas muestras se incubaron por 10 días, junto con las cepas bacterianas en estudio, sumergidas en medio de cultivo mínimo y sin fuente adicional de carbono. Al cabo del período de incubación se obtuvo un desplazamiento del petróleo residual atrapado en la matriz porosa, a expensa del cual crecieron los microorganismos. Se empleó la microscopía electrónica de barrido y la espectrometría de rayos X para verificar de manera directa la formación de biopelículas sobre las rocas, obteniéndose una colonización de todas las superficies, independiente-

mente de su litología. Seguidamente, la muestra de roca 1 se sometió a un proceso de limpieza y extracción del hidrocarburo atrapado en la matriz. Se tomó 1 ml del hidrocarburo extraído con cloroformo para estudios de resonancia paramagnética electrónica, la cual también se le realizó a la roca limpia. Se comprobó que aun después de la extracción se mantiene la presencia de hidrocarburos en la muestra, debido a la presencia de un radical libre correspondiente a materia orgánica. En adición, se utilizó la resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C para realizar un estudio de composición del hidrocarburo atrapado en la matriz rocosa. De esta manera se comprobó la condición de petróleo pesado por lo que se demuestra que las bacterias utilizadas tienen la capacidad de desplazar este tipo de crudo, confirniendoles un valor adicional para futuras aplicaciones en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

A partir de un petróleo crudo muestreado de un pozo de la Franja Norte Petrolera Cubana, se aislaron seis bacterias las cuales poseen características promisorias para procesos de MEOR. Dichas bacterias se identificaron como: *Bacillus subtilis* CC21, *Aeromonas veronii* CC22, *Bacillus subtilis* CC23, *Bacillus subtilis* CC31, *Bacillus subtilis* CC32 y *Bacillus licheniformis* CC33 (Hernández, 2018).

Muestras de núcleos de rocas

Se utilizaron tres muestras de núcleos pertenecientes a la capa productora de tres yacimientos petroleros de la Franja Norte Petrolera Cubana. Las rocas se fragmentan hasta alcanzar un cm^3 aproximadamente. Las características litológicas de las muestras en estudio se resumen en la **Tabla 1** (Miquel, 2018).

Incubación de las bacterias en medio líquido con fragmentos de rocas

Se evaluó la capacidad de las cepas en estudio para adherirse y formar biopelículas sobre la superficie de los fragmentos de núcleos antes descritos. Para ello, en frascos de 100 ml conteniendo 25 ml de medio de cul-

tivo mínimo (cuya composición es la siguiente: Na_2HPO_4 4.5 g/l; KH_2PO_4 3 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l; MgSO_4 0.2 g/l) se inoculó 100 μl de precultivos. Se sumergió en el líquido un fragmento de núcleo de 1 cm^3 .

No se agregó una fuente de carbono adicional. Los frascos se mantuvieron en condiciones estáticas y temperatura ambiente durante 10 días. Diariamente se realizó inspección visual del crecimiento bacteriano.

Tabla 1. Características petrográficas de las muestras de núcleos de la zona del reservorio.

Número de muestra	Descripción petrográfica	Profundidad [m]
1	Marga con porosidad por vóculos.	846
2	Carbonato arcilloso con presencia de pirita, naturalmente fracturado.	2035-2040
3	Caliza pelitomórfica con abundante pirita y poca porosidad.	3563-3568

Microscopía Electrónica de Barrido y Espectrometría de Rayos X

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para verificar la formación de las biopelículas sobre las rocas sometidas a las condiciones antes descritas. Al ser muestras de origen biológico, previa visualización se colocaron fijadas a la cámara de generación de vacío Quórum Q 150 T ES. A continuación, se aplicó una capa conductora de 15 nm dada por pulverización catódica con aleación Au/Pd (80/20). El microscopio contaba con un detector de rayos X del tipo «dispersivo» en energía (*Energy Dispersive Spectrometer*, EDS) que permite identificar las radiaciones características de cada uno de los elementos presentes en la muestra.

Extracción de petróleo de la muestra de roca

La selección, preparación y limpieza de muestras para determinar las propiedades del reservorio se realizó por la norma GOST 26450.0-85. Para extraer el hidrocarburo contenido en la matriz se sometió la muestra 1 a extracción con cloroformo, siguiendo la norma citada. Se tomó 1 ml del hidrocarburo extraído para estudios de resonancia paramagnética electrónica (RPE).

Resonancia paramagnética electrónica

Los espectros de la resonancia paramagnética electrónica (RPE) se obtuvieron utilizando un espectrómetro de banda X CMS-8400 a una frecuencia de 9.43 GHz.

Las muestras de rocas previamente se trituraron, pesaron y cargaron en ampollas de polietileno. El petróleo extraído de la muestra 1 se diluyó nuevamente añadiendo como solvente el cloroformo y se envasó 1g del mismo en ampolla de polietileno. Los espectros RPE para la muestra sólida y la líquida, se registraron a temperatura ambiente con un campo magnético de 360 mT (de 40 a 400) para el registro de iones Fe^{3+} , 140 mT (de 263 a 403) para el registro de iones Mn^{2+} y complejos de vanadilo (VO^{2+}) y 10 mT (de 329.3 a 339.3) para el registro de complejos de vanadilo (línea más intensa), iones de sulfito y de sulfato (SO_3^{2-} , SO_4^{2-}) y radicales libres orgánicos estables ($\text{R}^*\text{C}350$). El contenido de radicales e iones estables se midió en unidades arbitrarias (la amplitud de la señal EPR corregida para el ancho de línea, los valores obtenidos se correlacionaron con el peso de las muestras) (Khasanova, 2017).

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C

La medición cuantitativa se realizó mediante la integración de regiones específicas de los espectros de ^1H y ^{13}C de la resonancia magnética nuclear (RMN). El grado de sustancias aromáticas en la mezcla de hidrocarburos y solventes se evidenció por la integración de ambas técnicas. La información obtenida por integración cuantitativa de señales aromáticas en intervalos espectrales individuales se representa por la fracción

de los átomos de carbono correspondientes en relación con su número total. La fracción de carbonos aromáticos se encuentra directamente a partir de los espectros de RMN (Rakhmatullin, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incubación de las bacterias en medio líquido con fragmentos de núcleos de la zona de reservorio

Como un acercamiento inicial a las condiciones encontradas en los yacimientos, se evaluó la capacidad de las bacterias en estudio para adherirse y formar biopelículas sobre la superficie de tres núcleos de pozos (provenientes de la zona del reservorio de yacimientos

representativos de la Franja Norte Petrolera Cubana). El medio de cultivo era de composición mínima. Por otro lado, se evitó la aireación del medio mediante agitación para impedir altas concentraciones de oxígeno (simulando las condiciones anóxicas presentes en los yacimientos).

Transcurridos siete días se obtuvo turbidez en la totalidad de los casos analizados con las tres muestras de rocas. Se evidenció la presencia abundante de mucosidad sobre la superficie mineral y la aparición de gotas de petróleo y manchas negras sobre la misma. En la **Figura 1** se muestran dichos efectos.

Tales resultados demuestran la capacidad de



Figura 1. Incubación en medio de cultivo mínimo de las cepas bacterianas con las muestras de roca. Se señala con flechas negras las gotas de petróleo desplazadas desde la matriz y con rojas el material mucoide adherido a la superficie.

las bacterias en el estudio de utilizar el petróleo crudo como única fuente de carbono y energía. Lo significativo en este caso resultó que el crecimiento bacteriano se realizó a expensas del hidrocarburo atrapado en la matriz. Para ello es necesario no solo la colonización de la superficie, sino también la penetración de las bacterias o de sus bioproductos en la red porosa. La mucosidad apreciable en la superficie de las rocas indica la colonización y formación de biopelículas, independientemente de la litología (marga o carbonato). La aparición de las gotas de petróleo sobre la superficie de las rocas demuestra el desplazamiento del crudo contenido en los poros debido a fuerzas capilares. Investigaciones precedentes versadas en procesos de

MEOR han descrito el efecto que ejercen los microorganismos sobre la matriz porosa y el desplazamiento de la porción de petróleo que queda atrapada dentro de la misma (Martínez, 2011). La acumulación de biosurfactantes en la vecindad del poro disminuye la tensión superficial e interfacial, lo que favorece el desplazamiento de petróleo. Las cepas evaluadas producen dicho bioproducto, lo que fue demostrado en trabajos precedentes (Hernández, 2018), por tal motivo este efecto está presente y facilita el desplazamiento del crudo atrapado en la matriz. Estos resultados adquieren notable significación para futuros diseños de MEOR con el empleo de estas bacterias.

Microscopía electrónica de barrido y la espectrometría de rayos X

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para determinar directamente si existía colonización y formación de biopelículas en las muestras de rocas. La microscopía es una de las herramientas que más información facilita sobre la morfología, filogenia y arquitectura de este tipo de agrupación microbiana (Berrón, 2016). Previo al tratamiento bacteriano se uti-

lizó la misma técnica para estudiar la composición mineralógica de las rocas, una vez determinado que no existían bacterias en la superficie de las mismas. En la **Figura 2** se presentan los resultados obtenidos para la muestra de roca 1, la cual fue descrita petrográficamente como margas. En la columna A se muestran los análisis realizados previa a la incubación con las cepas bacterianas y en la B posterior al tratamiento microbiano.

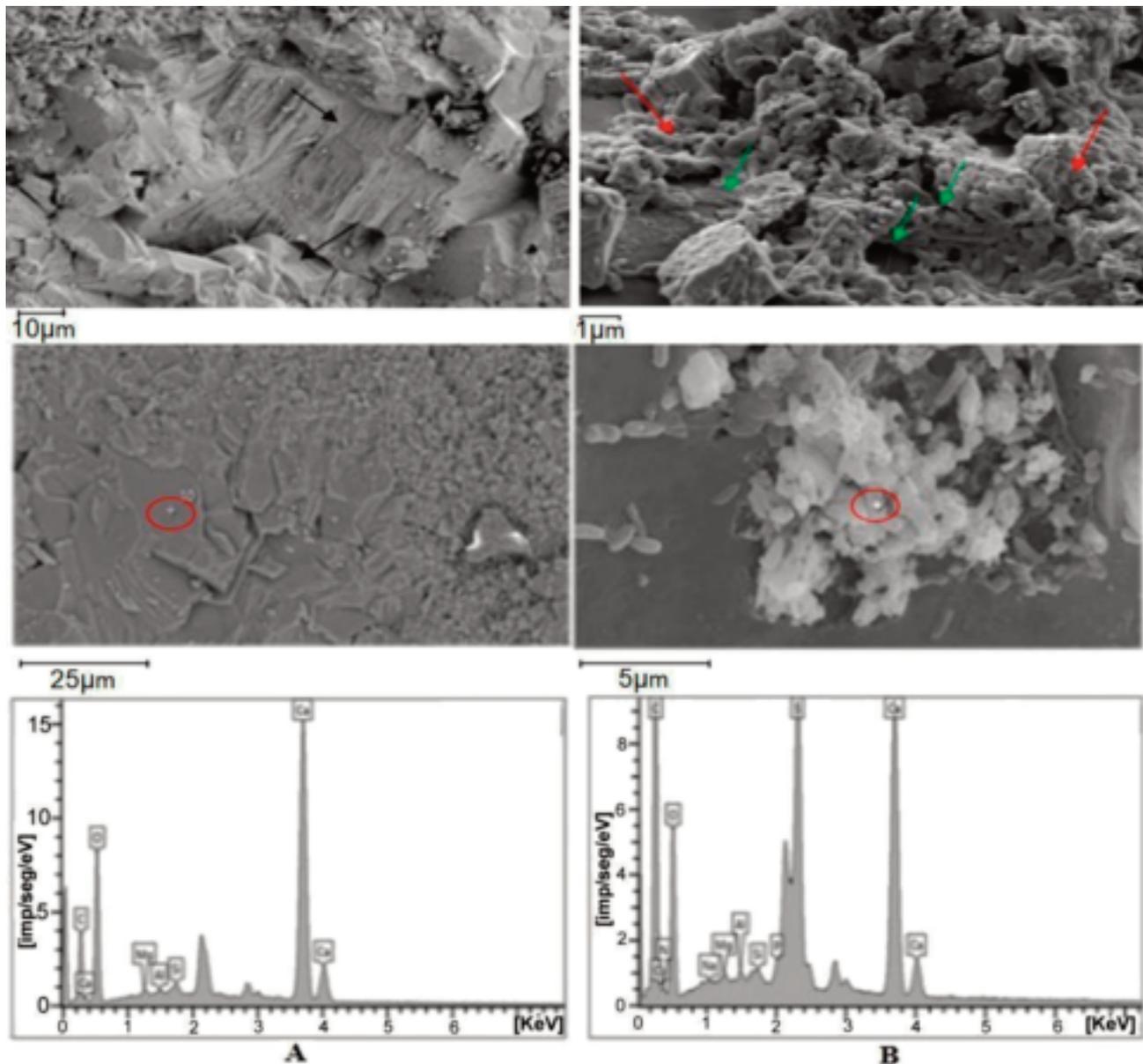


Figura 2. Imágenes de SEM y espectro de rayos X: previo (columna A) y después (columna B) del tratamiento microbiano con la roca 1. Se señala con flechas negras la morfología del carbonato, rojas las bacterias y verdes el exopolisacárido. Se circula en rojo el punto donde se realizó la espectrometría de rayos X.

En las imágenes de microscopía electrónica (con las escalas a 10 y 25 micrómetros), correspondientes a la roca sin tratar con las bacterias, se aprecia una zona con morfología de superficies planas y formas cúbicas (típica de carbonatos y la porción carbonatada de las margas). Además, se observa una zona con morfología atípica provocada por la presencia cuantiosa de hidrocarburos oxidados, lo cual se justifica ya que el núcleo fue tomado en la zona del reservorio. El espectro de rayos X en el punto señalado muestra abundancia de calcio (Ca), característico de las margas y los carbonatos. También aparecen otros elementos como: silicio (Si), magnesio (Mg) y aluminio (Al), característicos de las rocas sedimentarias.

Posterior a la incubación con las bacterias se observa a una escala de 10 μm gran acumulación bacteriana embebida en un material de aspecto mucoso. Este tipo de crecimiento es típico de las biopelículas, donde el exopolisacárido crea una matriz que le confiere dicho aspecto (Madigan *et al.*, 2014). Con un mayor acercamiento (escala de 5 μm) se observa otra estructura similar, donde se realizó el espectro de rayos X. En este punto se obtuvo el pico característico de Ca correspondiente a muestras carbonatadas. Se obtuvieron además picos característicos del Mg, Si y Al, lectura proveniente de la composición de la roca. Por otro lado, se aprecian espectros correspondientes a carbono (C), azufre (S), nitrógeno (N), fósforo (P) y sodio (Na). Estos elementos no se encuentran en el espectro obtenido en la roca sin la exposición a las bacterias lo que corrobora su origen biogénico, ya que los mismos forman parte de la composición de biomoléculas presentes en las bacterias. Por tanto, se demuestra de forma visual (mediante microscopía) y gráfica (por espectrometría), la colonización en forma de biopelículas bacterianas de la superficie de la roca en estudio.

Las muestras dos y tres se analizaron de la misma manera. Estos resultados se muestran en las **figuras 3 y 4**, respectivamente.

En el caso de la muestra de roca 2, se había descrito con anterioridad como un carbonato arcilloso (Miquel, 2018). Este hecho quedó corroborado mediante la microscopía ya que además de las formas ca-

racterísticas del carbonato, se apreciaron superficies en forma de escamas, lo que es típico de las arcillas. La espectrometría de rayos X ratificó que el pico mayor correspondía al Ca. En esta misma muestra después de la exposición a las bacterias se observó una colonización bacteriana de casi la totalidad de la superficie visualizada, independientemente de la litología o de los minerales a los que se exponían (columna B de la **Figura 3**). Se observa en el espectro una alta presencia de Ca, característico de los carbonatos. Por otro lado, se encontró un pico considerable de C, el cual está determinado por la presencia abundante de compuestos orgánicos producidos por las bacterias, así como parte estructural de las propias células. Se observan otros elementos como hierro, sodio, azufre y potasio, cuya acumulación también se relaciona con el metabolismo microbiano.

La muestra 3 se describió como caliza pelito-mórfica con abundante pirita, lo que fue corroborado por la presencia en el espectro de picos característicos del azufre y del hierro. Como en los casos anteriores se obtuvo crecimiento y colonización de la superficie de la roca analizada.

De manera general, se demostró la colonización bacteriana de todas las superficies rocosas en estudio, tanto las carbonatadas como las arcillosas y el aumento de compuestos biogénicos en las zonas colonizadas. Este hecho adquiere notable significación al diseñar procesos de MEOR ya que no limita su aplicación a un tipo específico de yacimiento. Además, se lograron obtener por primera vez imágenes nítidas donde se aprecia la formación de biopelículas y la evaluación composicional de las superficies de núcleos de pozos de la zona del reservorio sobre las cuales se adhirieron. La unión de estudios litológicos, químicos y microbiológicos en procesos de MEOR desempeña un papel primordial para el correcto entendimiento de los fenómenos que ocurren *in vivo* dentro del yacimiento.

Resonancia paramagnética electrónica (RPE)

Existen diferentes métodos de estudio para evaluar las perspectivas de la generación de hidrocarburos líqui-

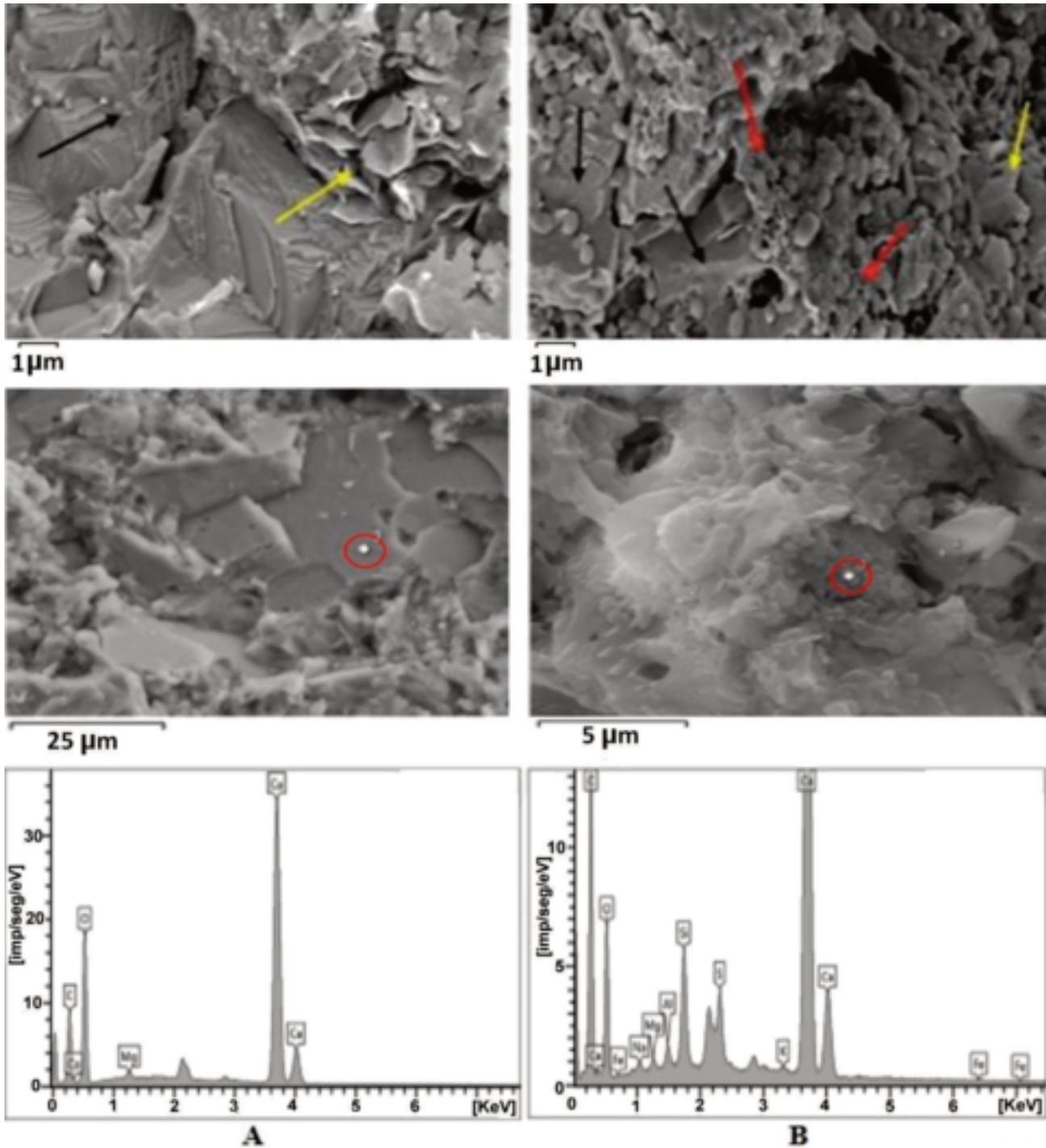


Figura 3. Imágenes de SEM y espectro de rayos X: previo a la incubación con bacterias (columna A) y después del tratamiento microbiano (columna B) con la roca 2. Se señala con flechas negras la morfología del carbonato, amarillas la arcilla y rojas las bacterias. Se circula en rojo el punto tomado para la espectrometría de rayos X.

dos en función de la composición de la materia orgánica en las rocas y su estabilidad térmica. Para este fin la resonancia paramagnética electrónica (RPE) desem-

peña un papel significativo (Khasanova, 2017). La esencia del fenómeno RPE es la absorción de resonancia de la radiación electromagnética por electrones de-

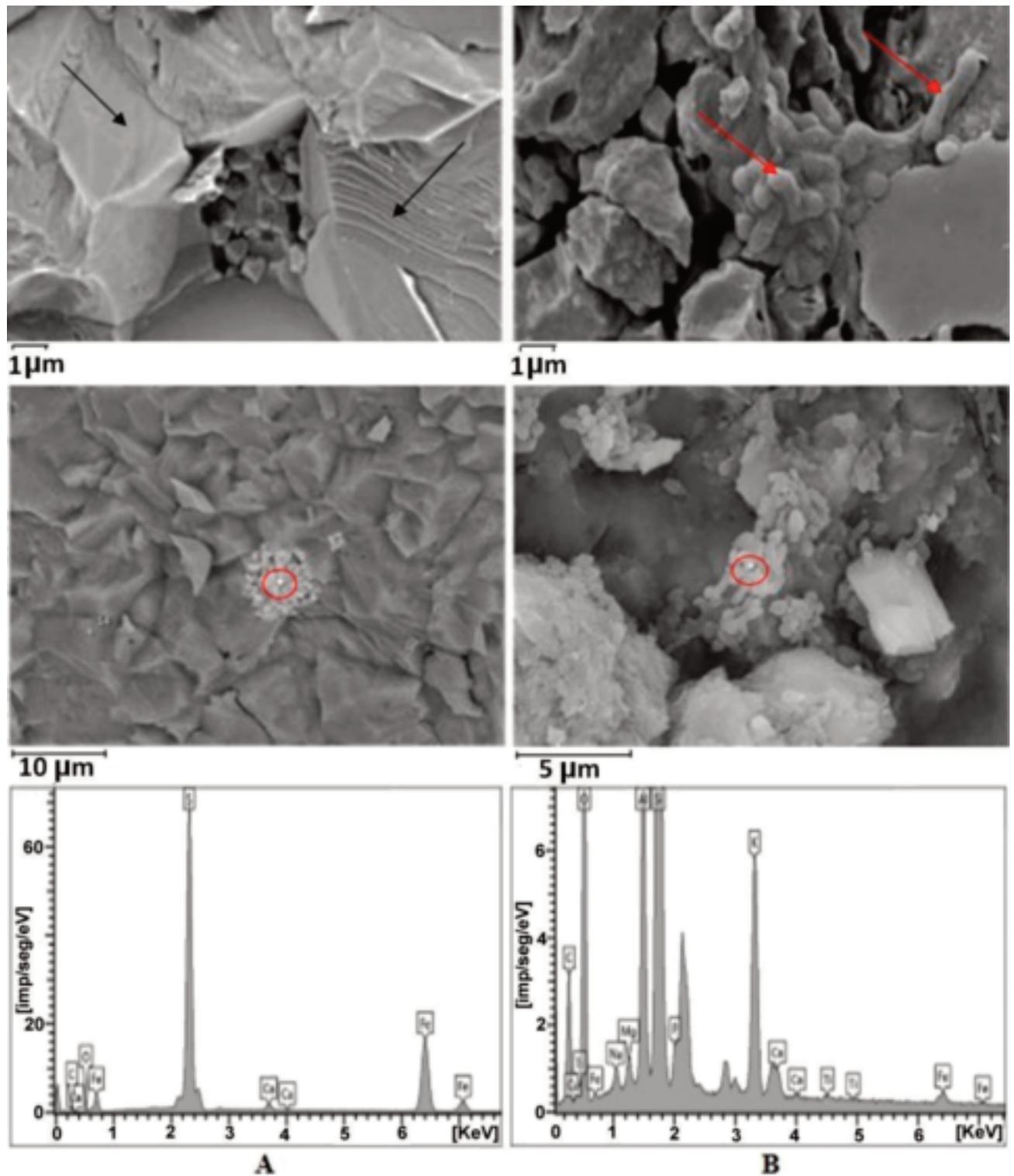


Figura 4. Imágenes de SEN y espectro de rayos X: previo a la incubación con bacterias (columna A) y después del tratamiento microbiano (columna B) con la roca 3. Se señala con flechas negras la morfología del carbonato y rojas las bacterias. Se circula en rojo el punto tomado para la espectrometría de rayos X.

sapareados. El objeto de estudio de la RPE son los radicales libres estables, los llamados centros paramagnéticos (Khasanova, 2017). Los radicales libres son un criterio de diagnóstico confiable en la reconstrucción de ambientes sedimentarios, así como en la estratificación y la correlación de secciones de rocas sedimentarias. Los radicales libres reflejan la composición de los componentes del carbonato, muestran la presencia de materia orgánica, indican la ferruginización

y otras características de la composición de las rocas (Khasanova, 2017).

Para el estudio con RPE se tomó una porción de la roca 1 posterior a la limpieza y de los hidrocarburos extraídos de la misma. En la **Figura 5** se muestran los espectros obtenidos tras la medición de RPE realizada al fragmento de núcleo en estudio. Es posible identificar un radical libre desconocido en la región central del espectro (3280-3300 Gs).

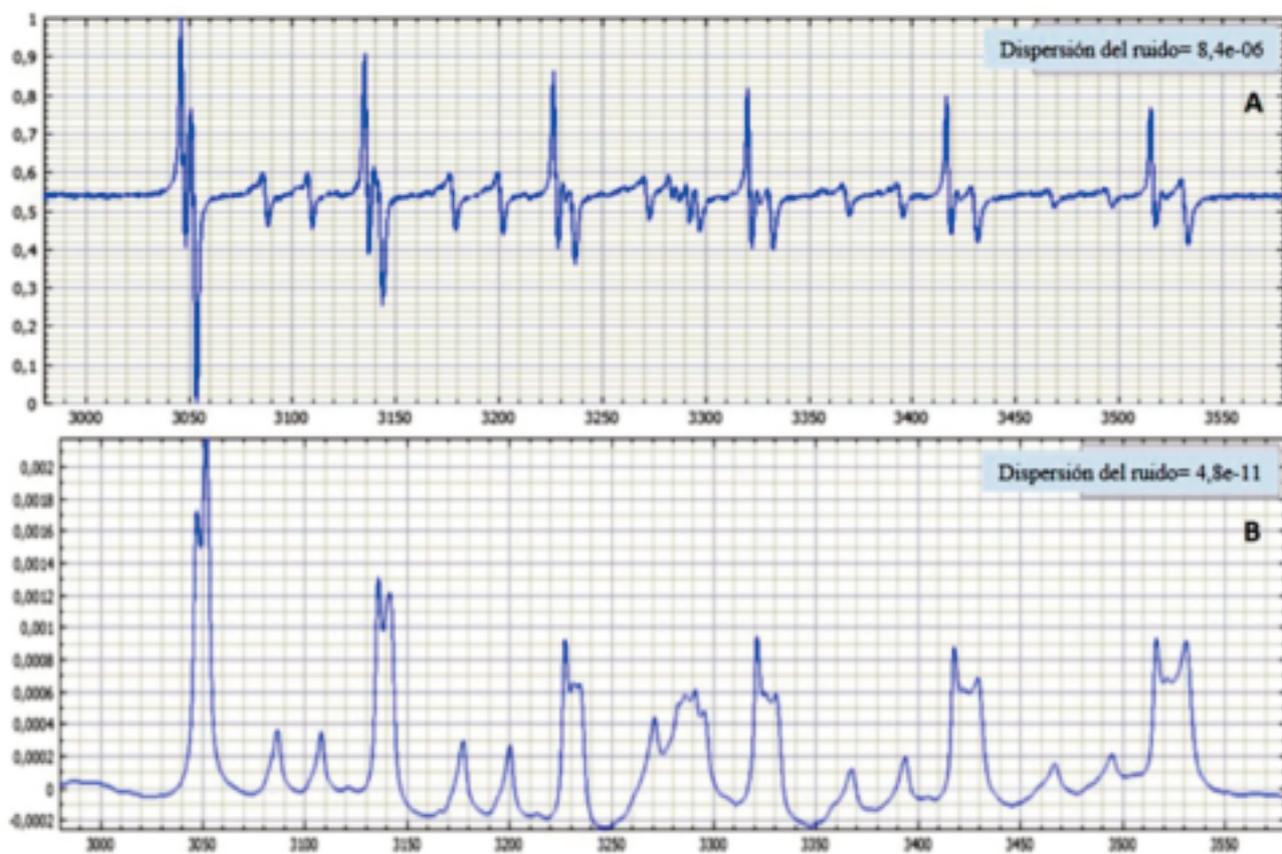


Figura 5. Espectro de RPE de la muestra de roca 1 (A) y el espectro integrado (B).

Se evidenció la presencia de dos líneas a una distancia de aproximadamente 9 mT entre sí. Esto se debe a dos centros paramagnéticos de iones Mn^{2+} . La **Tabla 2** muestra los valores de los parámetros calculados para cada centro (factor-g y A).

Los valores obtenidos se corresponden con las estructuras cristalinas de la calcita y el cuarzo (Miquel, 2018). Ambas litologías son características de las rocas reservorios cubanas, y su presencia se co-

rresponde con la descripción petrográfica de la muestra en estudio (**Tabla 1**).

Para estudiar el radical libre encontrado en el centro del espectro se analizó la dependencia de la intensidad de las líneas de RPE en el rango presentado sobre el valor de la potencia (\sqrt{M}) (**Figura 6**).

Del análisis de la **Figura 6 C** se deduce que los picos P 2 y P 3 son de naturaleza diferente a los otros picos estudiados. El comportamiento seguido

Tabla 2. Centros 1 y 2 del espectro completo.

Centro 1 para el Mn^{2+}	A= 94.2 Gs y g-factor = 2.0041
Centro 2 para el Mn^{2+}	A= 95.7 Gs y g-factor = 1.9969

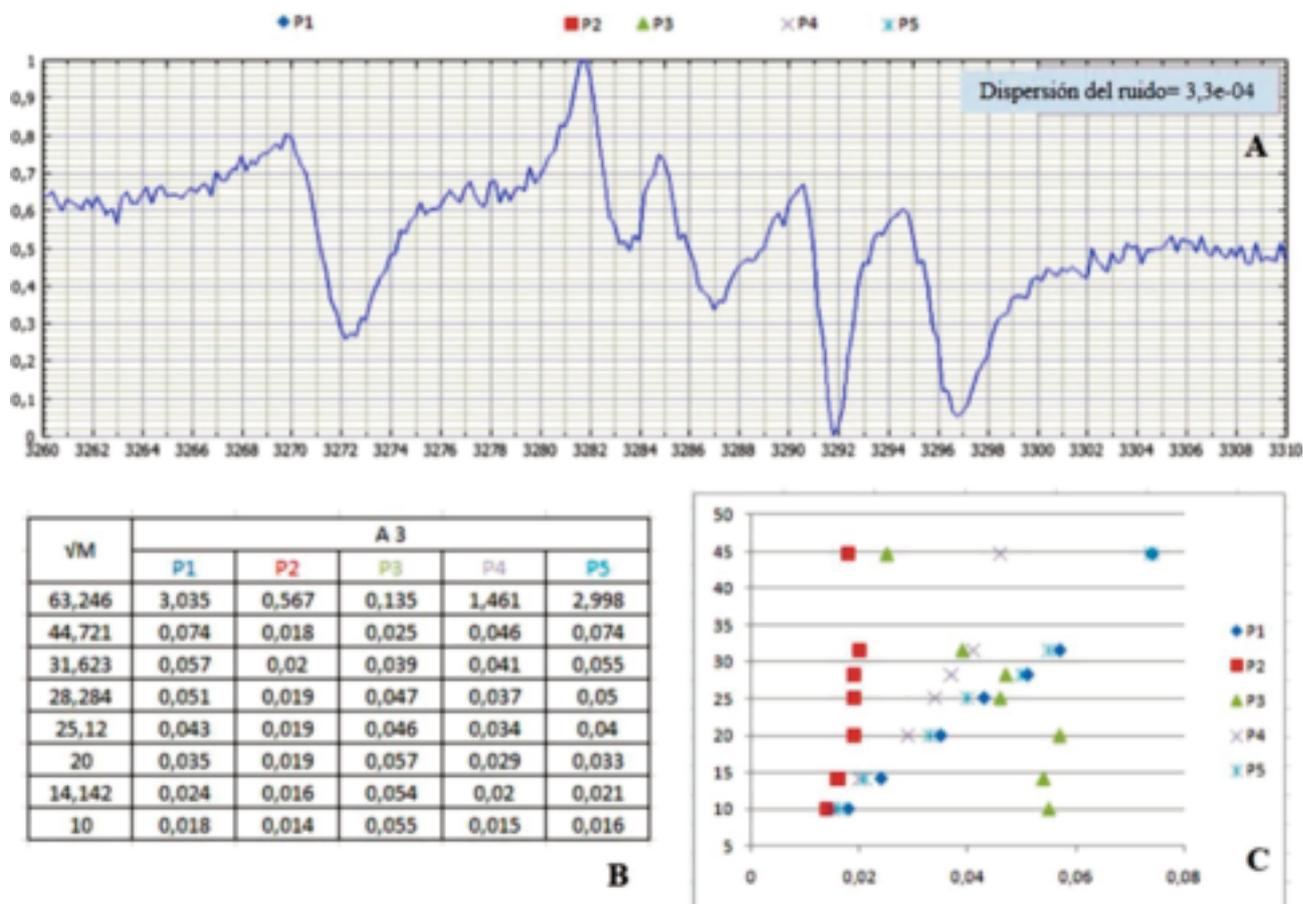


Figura 6. Espectro de RPE de la muestra de roca 1 en el intervalo 326-331 mT (A). Los picos del espectro están numerados (P1-P5), cada uno de los cuales se identifica con un color y símbolo (Tabla B y Gráfico C).

por P 1, P 4 y P 5 es característico del manganeso, mientras que P 2 y P 3 se alejan de esta tendencia. Estos resultados indican la presencia en el espectro de otros centros paramagnéticos, descritos como radicales provenientes de los hidrocarburos (Miquel, 2018).

De manera similar se procedió para la medición del hidrocarburo extraído de la muestra de roca 1, estos resultados se muestran en la **Figura 7**.

Para analizar los resultados obtenidos en la **Figura 7** se debe tener en cuenta que las muestras líquidas estudiadas son una mezcla de hidrocarburos

con el solvente utilizado en la extracción (cloroformo). En la **Figura 7B** se muestra claramente el pico característico del hidrocarburo en la zona de 3270-3300 Gs, con factor-g = 2.004 y un ancho de línea de aproximadamente 6 G.

Comparando los resultados de la muestra de roca (**Figura 6**) y de la muestra líquida (**Figura 7**) se concluye que aun después de la extracción con cloroformo se mantiene la presencia de hidrocarburos en la muestra. De esta manera se corroboró que las rocas contenían petróleo en la matriz porosa, el cual fue

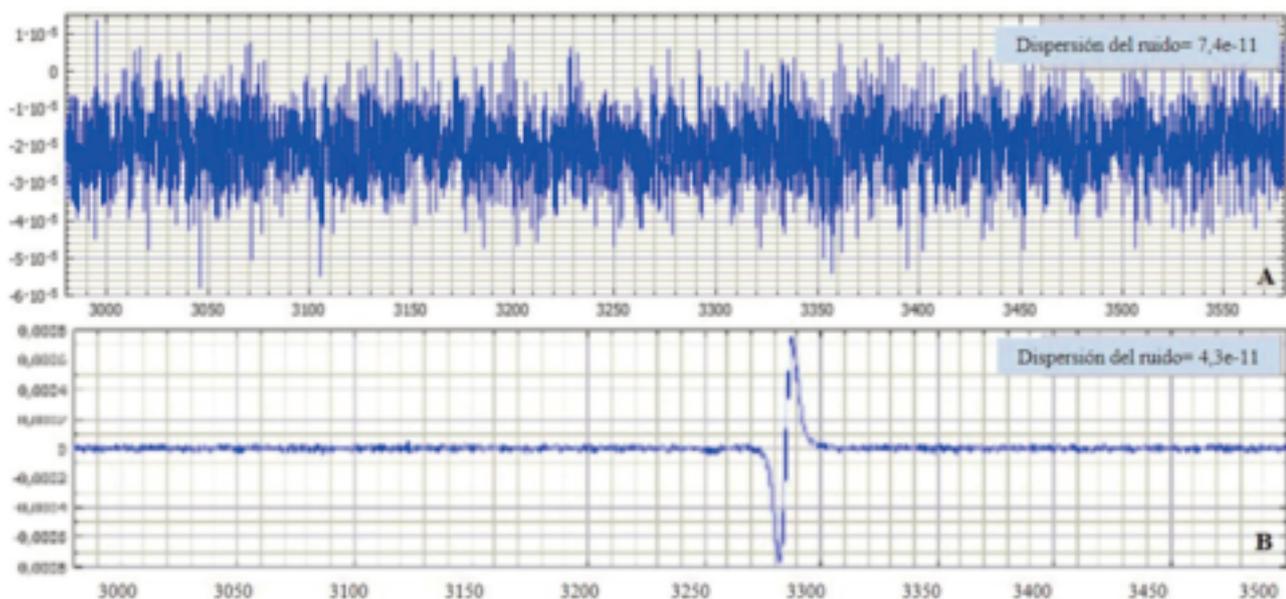


Figura 7. Comparación entre los espectros resultantes de RPE en cloroformo (A) y en la mezcla de hidrocarburo-solvente extraída de la muestra de roca 1 (B).

desplazado hasta la superficie por la acción de las bacterias estudiadas y por los bioproductos que las mismas generan.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C

La tecnología de RMN es utilizada en el sector petrolero desde la década de 1990, como registros geofísicos (Akkurt, 2009). Sin embargo, la utilización de RMN de ^1H y ^{13}C como técnica de caracterización de la composición de hidrocarburos fue considerado un descubrimiento de escala novel en esta área (Rakhatullin, 2017). En contraste con otros métodos físicos y químicos, la RMN permite obtener información tanto cualitativa como cuantitativa en una mezcla de compuestos orgánicos.

La RMN tiene la ventaja de proveer directamente detalles moleculares determinando propiedades físico-químicas de una muestra a nivel macroscópico. Un espectro de RMN contiene información de los grupos funcionales y, si es corrido con la resolución apropiada, puede permitir la caracterización de una muestra a nivel molecular. La espectrometría de RMN de ^1H es un método relativamente rápido, no destructivo, y no requiere una compleja preparación de

la muestra. Con este método, además de la composición del crudo, se obtiene: los grados API, los residuos de carbono, temperatura aparente y el nitrógeno orgánico básico. Si además se incluyen datos del estudio de ^{13}C RMN se puede extraer mucha más información de la composición química de la muestra (Rakhatullin, 2017). Ambos métodos se basan en la determinación de la composición de un crudo de acuerdo con la cantidad relativa de moléculas de los diferentes grupos: aromáticos, olefinas, alcanos y cicloalcanos y el número de sus isómeros análogos.

Para el análisis cuantitativo, se midieron las señales del espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del hidrocarburo extraído de la muestra de reservorio 1. Los espectros resultantes se muestran en la **Figura 8**. En dicha figura la primera señal (parte superior del espectro) corresponde al patrón nombrado «petróleo cubano» y que cuenta con las siguientes propiedades: viscosidad 49700 mPa*s, saturados: 30.96 %, aromáticos: 39.18 %, resinas: 14.17 %, asfaltenos: 15.69 %.

En la **Figura 8A** se muestra el espectro de RMN de ^1H , en el cual la mayor concentración de moléculas de hidrocarburos está distribuida a la derecha del espectro en forma de un doblete entre 0.5 y 3.5 ppm. En este intervalo se encuentran la mayoría de los

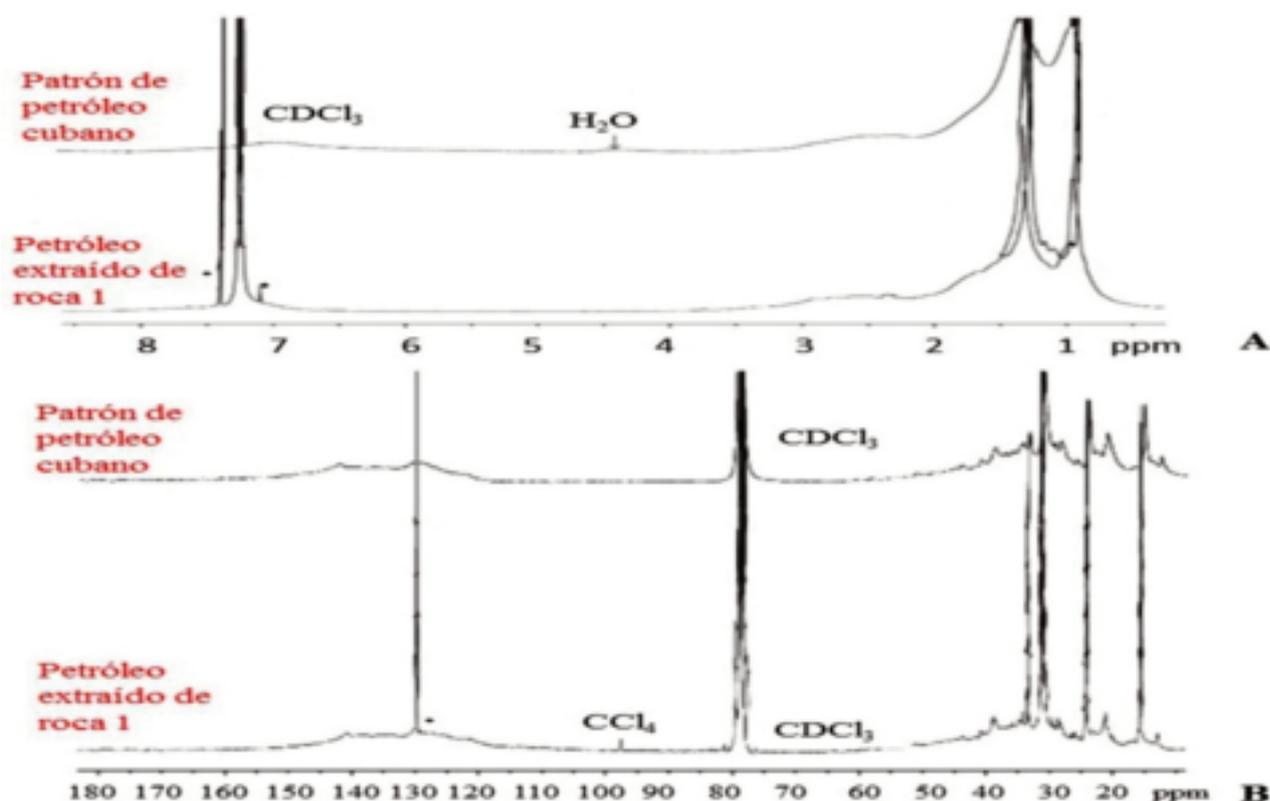


Figura 8. Espectros de RMN de ^1H (A) y ^{13}C (B) (700 MHz) a 300 K. * - señales de impurezas.

grupos aromáticos como se muestra en la **Tabla 3**. A la izquierda del espectro se aprecia una segunda zona de interés, con picos entre 7 y 8.5 ppm. En este intervalo se distinguen las señales características del disolvente (CDCl_3) y las correspondientes a los protones di, tri y tetra-aromáticos. Nótese también la presencia de se-

ñales de impurezas en las muestras destacadas por un asterisco (*).

En la **Figura 8 B** se muestran las señales de los espectros de RMN de ^{13}C , donde se aprecia una primera zona de interés a la derecha en el intervalo de 10 a 50 ppm. En la misma se encuentran los hidrocarburos aro-

Tabla 3. Distribución de los desplazamientos químicos en la señal de RMN de ^1H (Rakhmatullin, 2017).

RMN de ^1H intervalo de desplazamientos químicos [ppm]	Grupos funcionales orgánicos
0.5-1.0	Grupo $\gamma\text{-CH}_3$ - y algunos grupos CH- y CH_2 - en fragmentos nafténicos
1.0-1.7	Grupo $\beta\text{-CH}_2$ - y algunos grupos $\beta\text{-CH-}$ en compuestos aromáticos
1.7-1.9	Grupo $\beta\text{-CH-}$, grupos CH_2 - en compuestos hidroaromáticos
1.9-2.1	Grupo metil (CH_3) en α -olefinas
2.1-2.4	Grupo metil (CH_3) en α -posición a los carbonos aromáticos
2.4-3.5	Grupos CH- y CH_2 - en α -posición los carbonos aromáticos
3.5-4.5	Puente de grupos CH_2 - (difenilmetano)
4.5-6.0	Protones de los grupos de olefinas
6.0-7.2	Protones de arenos de ciclo simple
7.2-8.3	Protones di-, tri- y tetra-aromáticos
8.3-8.9	Algunos protones tri- y tetra-aromáticos

Tabla 3. Distribución de los desplazamientos químicos en la señal de RMN de ^1H (Rakhmatullin, 2017).

máticos y naftalénicos con grupos metilenos y etilenos. Además, se distingue la señal del disolvente (CDCl_3), separada de la segunda zona de interés, en la que se encuentran moléculas más pesadas, en el intervalo de 115 a 150 ppm. En este caso también se aprecian las impurezas, señaladas con un asterisco (*). Se observa, además, la línea correspondiente al CCl_4 , disolvente utilizado. En la **Tabla 4** se muestran los valores de distribución de los desplazamientos químicos en la señal de RMN de ^{13}C de los grupos funcionales que definen la composición de las muestras de hidrocarburo.

El espectro de RMN de ^{13}C contiene numerosas señales distinguibles, las cuales pueden ser asignadas a diferentes regiones típicas y brindar información sobre las fracciones primarias Cp, (grupos metílicos CH_3), secundarias Cs (grupos metilenos CH_2), terciarias CT (grupos metilos CH), cuaternarias CQ (C) y átomos aro-

máticos CAR (**Tabla 4**).

Debido a la complejidad de la separación de las señales como las de Cp y CQ, la estimación del contenido molar de varios grupos de carbono se determinó por la suma de los contenidos CT y CAR, resultante de la integración de las regiones correspondientes en el espectro de RMN de ^{13}C .

Se realizó un análisis cuantitativo de estos resultados mediante la integración de regiones específicas de los espectros de ^1H y ^{13}C RMN. El grado de sustancias aromáticas en la mezcla, definido por la RMN ^1H , se comparó con las proporciones de átomos aromáticos de hidrógenos y carbono obtenidos del estudio de RMN ^{13}C , para determinar el grado de sustitución de aromáticos en la fracción de crudo estudiada (Rakmatullin, 2017).

En la **Tabla 5** se muestran las fracciones mola-

Tabla 4. Distribución de los desplazamientos químicos en la señal de RMN de ^{13}C (Rakmatullin, 2017).

RMN de ^{13}C intervalo de desplazamientos químicos [ppm]	Grupos funcionales
11.0-12.5	Grupos $\gamma\text{-CH}_3$ - y grupos CH- y CH_2 - en fragmentos de aromáticos, grupos CH_3 - en cicloheptanos etil-sustituídos
12.5-15.0	Grupos $\gamma\text{-CH}_3$ - metil (y más distantes) de ciclo aromático; grupo CH_3 -, blindado por dos anillos aromáticos vecinos
15.0-18.0	Grupos $\beta\text{-CH}_3$ - sustituido en el grupo etileno
18.0-20.5	Grupo $\alpha\text{-CH}_3$ -, unido a un anillo aromático; algunos grupos $\alpha\text{-CH}_3$ - y CH_2 - en fragmentos de aromáticos y naftalenos
20.5-22.5	Grupo $\alpha\text{-CH}_3$ -, algunos grupos $\alpha\text{-CH}_3$ - y CH_2 - en fragmentos de aromáticos y naftalenos
22.5-24.0	Grupos $\gamma\text{-CH}_2$ - y CH_3 -; grupos $\beta\text{-CH}_2$ - en estructuras de tetralina sin sustituir
24.0-27.5	Grupos metileno (CH_2) en fragmentos de naftalenos; grupos $\alpha\text{-CH-}$ y $\beta\text{-CH}_2$ - en fragmentos de propilo; grupo $\beta\text{-CH}_3$ - en isopropilo
27.5-37.0	Grupos metileno (CH_2), compuestos no ligados con el grupo metilo (CH) en alquilos; grupo metileno (CH_2) en ciclo.
37.0-60.0	Grupo metileno (CH) en fragmentos de alquilo; grupos CH y CH_2 por fragmentos de naftalenos, adyacentes al grupo CH
108.0-118.0	Fragmentos de olefinas
118.0-129.5	Arenas protonadas
129.5-133.0	Átomos carbono-aromáticos internos
133.0-135.0	Arenas metil-sustituídas
135.0-138.0	Arenas, sustituidos por naftalenos
138.0-160.0	Arenas de alquilos sustituidos (a excepción de metilo sustituido); arenas heteroatómicas (N, O, S)
165.0-175.0	Éster o amida
170.0-182.0	Ácido carboxílico

res (dadas en %) de las distintas fracciones de hidrocarburos, tanto de la muestra en estudio como las del patrón de petróleo cubano. Los valores obtenidos para cada parámetro en la muestra extraída de la roca 1 se compararon con los mismos valores del patrón, el cual se conoce que es pesado (49700 mPa*s). Se aprecia que en la muestra la mayor cantidad de fracciones son las secundarias y cuaternarias representadas por el parámetro C_{sq} , con un valor de 47.8 %. En segundo lugar se encuentran las fracciones aromáticas (CAR) que representan el 30.6. La cantidad de carbono primario de la muestra en estudio es la mitad de la del patrón de petróleo cubano (9.1 %). El bajo valor de C_p implica que en la mezcla de hidrocarburos existirán menos cadenas lineales (con CH_3 en los extremos) o más ramificaciones. Otro factor importante es la aromaticidad, lo que también determina la pesadez de la muestra. En el caso

de los hidrocarburos extraídos de la roca 1 se obtuvo un 30.6 % de C_{ar} y un factor de aromaticidad de 0.306 (ambos valores superiores respecto al patrón). De todo esto se desprende que el petróleo analizado corresponde a un crudo pesado, ya que el mayor por ciento de los componentes de la muestra está determinado por fracciones pesadas (Rakhmatullin, 2017). Respecto al patrón conocido de petróleo cubano pesado, los hidrocarburos extraídos de la muestra de roca 1 presentan mayores valores que determinan la pesadez del mismo.

Una vez comprobada la naturaleza pesada del crudo contenido en la matriz porosa de la muestra del reservorio 1, se puede afirmar que las bacterias analizadas: *B. subtilis* CC21, *A. veronii* CC22, *B. subtilis* CC23, *B. subtilis* CC31, *B. subtilis* CC32 y *B. licheniformis* CC33 (Hernández, 2018), tienen la capacidad de desplazar este tipo de crudo. Este hecho toma gran sig-

Tabla 5. Resultados basados en el espectro de RMN de ^{13}C .

Parámetros [%]	Patrón de petróleo cubano	Muestra de roca 1
Fracciones molares primarias C_p	18.8	9.1
Fracciones molares secundarias + cuaternarias C_{sq}	38.6	47.8
Fracciones molares terciarias C_t	15.1	12.5
grupos aromáticos C_{ar}	27.5	30.6
factor de aromaticidad F_{CA}	0.275	0.306
largo de la cadena principal de hidrocarburos alifáticos MCL	7.7	15.2

nificación si se tiene en cuenta que las fracciones aromáticas y las largas cadenas con sustituyentes son más difíciles de degradar y de utilizar como fuente de carbono y energía por parte de los microorganismos. Unificando estos resultados con los obtenidos en investigaciones anteriores (Hernández, 2018), se ha demostrado la potencialidad del consorcio bacteriano en estudio para la recuperación de petróleos pesados.

CONCLUSIONES

Se evidenció que los aislados bacterianos producen biopelículas en las superficies de fragmentos de núcleos de

pozos con litologías características de la Franja Norte Petrolera Cubana. El análisis de espectrometría de rayos X mostró el aumento del contenido de carbono y otros elementos biogénicos respecto a las muestras no incubadas con las bacterias.

Mediante las mediciones de resonancia paramagnética electrónica realizadas a la roca 1, se obtuvo un radical en el centro del espectro que corresponde a hidrocarburos presentes en la muestra, aun después de la extracción con cloroformo. Este mismo estudio realizado al petróleo extraído mostró un espectro de un solo pico perteneciente al mismo radical libre de hidrocar-

buro encontrado en la muestra de roca.

Al hidrocarburo extraído se le realizaron estudios por espectroscopía de RMN ¹H y ¹³C de alta resolución, lo que permitió definir la composición química y la cuantificación de las fracciones de petróleos. Se obtuvo un factor de aromaticidad de 0.306 y un predominio de los carbonos secundarios, terciarios y cuaternarios, comprobando el carácter pesado del crudo.

AGRADECIMIENTOS

En una investigación hay mucho que agradecer a innumerables personas. Un especial agradecimiento a la doctora Polina Yurevna Galinskaya y a todos los trabajadores del Laboratorio de Ecología de la Universidad Federal de Kazán, Federación Rusa, por su apoyo incondicional. Además, a Yuri Ocin Nikolayevich, por su incalculable ayuda para la realización de la microscopía electrónica y la espectrometría de rayos X.

REFERENCIAS

Akkurt, R., Aramco, D. S., Rómulo, C., Clamart, N. H., Aberdeen, J. W., 2009, La resonancia magnética nuclear revela todo su potencial: Oilfield Review, 1-20.

Al-Sulaimani, H., Joshi, S., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A. y Al-Bemani, A., 2011, Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects: Biotechnol. Bioinf. Bioeng, 1(2):147-158.

Berrón, A., 2016, Evaluación de la capacidad de formación de biofilms por parte de cepas salvajes de *Listeria monocytogenes* resistentes a amonio cuaternario. Análisis, cuantificación y detección: España, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Ciencia Animal y de Alimentos, Tesis de maestría, 60 pp.

Gost 26450.0-85, 1985, Rocks. General requirements for sampling and sample preparation for determination of collecting properties, Federación Rusa.

Hernández T., 2018, Potencialidades del uso de microorganismos para aumentar la recuperación de petróleo del yacimiento Boca de Jaruco (Cuba): Federación Rusa, Instituto de Geología y Tecno-

logías del Petróleo y Gas, Universidad Federal de Kazán, Tesis de maestría, 115 pp.

Khasanova, N. M., Gabdrakhmanov, D. T., Kayukova, G. P., Mikhaylova, A. N., Morozov, V. P., 2017, Magnetic resonance in solids (en línea), en Electronic Journal KPFU, <<http://mrsej.kpfu.ru>>, consulta: 25 de enero de 2018

Kohr, W., 2012, Microbial enhanced oil recovery methods: Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, Patente No. MX 2012002380 A.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., 2014, Metabolism and Growth, in Espinoza, D. (ed.), Brock Biology of Microorganisms: San Francisco, Pearson Education, 118-149

Martínez, X., 2011, Producción de biotensoactivos por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos: México, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Tesis para obtener el título de Ingeniero Ambiental.

Miquel, L., 2018, Estudio de muestras de rocas saturadas de hidrocarburos utilizando nuevas técnicas de resonancia magnética nuclear: Federación Rusa, Instituto de Geología y Tecnologías del Petróleo y Gas, Universidad Federal de Kazán, Tesis de maestría, 84 pp.

Rakhmatullin I. Z., Efimov, S. V., Margulis, B. Y., Klochkov, V. V., 2017, Qualitative and quantitative analysis of oil samples extracted from some Bashkortostan and Tatarstan oilfields based on NMR spectroscopy data. Electronic Journal of Petroleum Science and Engineering. Kazan Federal University.

Zhang, X., Xiang, T., 2010, Review on Microbial Enhanced Oil Recovery Technology and Development in China, International Journal of Petroleum Science and Technology, 4(1):61-80.

Fueron recibidos	10-marzo-2020
corregidos	14-mayo-2020
aprobados	29-mayo-2020