

MICROBIOS PARA REDUCIR LA VISCOSIDAD DEL PETRÓLEO PESADO Y SU PROCESO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado y, de este modo, mejorar la recuperación del petróleo en un pozo petrolero, empleando un consorcio de microbios. En particular, la presente invención se refiere a un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero empleando un consorcio de microbios que comprende un microbio con el número de entrada MTCC 5983.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La energía es uno de los factores más importantes para la prosperidad global. Entre todas las fuentes de energía del mundo, el petróleo es el combustible de uso más común, aportando casi la mitad de la energía total utilizada. Por lo general, en los petróleos crudos, los asfaltenos, las resinas y los alcanos de petróleo componen un sistema estable y dinámico, en el que los alcanos de petróleo actúan como disolventes, los asfaltenos como micelas y las resinas como estabilizadores. Pero en los petróleos pesados, los asfaltenos al tener una cantidad abundante de heteroátomos (N, S y O), provocan efectos nocivos en la extracción, el transporte y el procesamiento del petróleo. Estos elementos hacen de la producción del petróleo una tarea más ardua y onerosa, por su potencial de obstruir los pozos petroleros y oleoductos.

Con el agotamiento constante de los recursos de petróleo ligero y los altos precios sostenidos del petróleo, el enfoque principal está cambiando ahora, orientándose a la utilización de estas reservas de petróleo pesado. Se estima que los depósitos mundiales de hidrocarburos pesados alcanzan

un total de casi 6.4 trillones de barriles (bbl). Pero solo alrededor de 500 billones a 1,000 billones se consideran recuperables con la tecnología convencional. Esto incluye los métodos químicos y físicos. La incorporación de aditivos (reductor de la fluidez crítica, mejorador de flujo, agentes reductores de la viscosidad), calentar el petróleo, mezclarlo con petróleos más ligeros o gases de hidrocarburos, así como también, emulsiones de aceite en agua se han aplicado con éxito. No obstante ello, los procesos de recuperación química son costosos, con baja eficiencia de barrido, y dependen de la competencia del compuesto para romper los enlaces organoazufre. A menudo, el calentamiento requiere una cantidad considerable de energía, y se presentan ciertos problemas logísticos al usar diluyentes como los hidrocarburos más ligeros.

Existen sistemas bacterianos como el que se describe en el documento de patente de los EE. UU. con el número 2907389, que utilizan el petróleo como fuente de carbono para producir tensioactivos biológicos, en presencia de oxígeno. Hay categorías aeróbicas y anaeróbicas en los métodos MEOR [*Microbial Enhanced Oil Recovery*, recuperación microbiana mejorada del petróleo]. El sistema aeróbico de MEOR, según se describe en el documento de patente de los EE. UU. con el número US 3,332,487 y el sistema bacteriano anaeróbico, como se describe en el documento de patente con el número WO 89/10463 y una combinación de sistemas bacterianos aeróbicos y anaeróbicos, tal como se describen en el documento de patente con el número US 5,492,828. El reservorio de petróleo normalmente está en condiciones anaeróbicas, y las cepas bacterianas anaeróbicas estarán allí como microbios indígenas, que pueden ser de utilidad para facilitar la recuperación del petróleo. Al mismo tiempo, los

microorganismos añadidos exógenamente que pueden usar petróleo como única fuente de carbono o pueden requerir una fuente de carbono para su desarrollo, como se describe en el documento de patente de los EE. UU. con el número US 5,492,828 donde se emplearon cultivos en mezcla de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, que utilizan el petróleo crudo como única fuente de carbono para mejorar la recuperación de petróleo.

Las nuevas tecnologías para recuperar este petróleo residual ofrecen la solución más oportuna y rentable para revertir el decaimiento de la producción interna de petróleo y para aumentar las reservas de petróleo del estado. El proceso de recuperación de petróleo basado en microbios es una de dichas metodologías y tiene varias ventajas únicas que hacen de él una alternativa atractiva desde el punto de vista económico, en relación con otros procesos para mejorar la recuperación del petróleo. Este proceso no consume grandes cantidades de energía, como sí sucede con los procesos de recuperación térmica y no dependen del precio del petróleo crudo, como es el caso con muchos procesos químicos de recuperación. Dado que el desarrollo de los microbios se produce a índices exponenciales, debería ser posible producir grandes cantidades de productos útiles rápidamente, a partir de recursos renovables y económicos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, donde dicho proceso comprende: (a) obtener una población enriquecida de un consorcio de microbios, la cual comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983; (b) poner en contacto dicha población enriquecida del consorcio de microbios con el petróleo en un pozo

petrolero, tras lo cual el agua se pone en contacto con el petróleo en el pozo petrolero; y (c) permitir que dicha población enriquecida del consorcio de microbios prolifere en el pozo petrolero, donde dicho proceso reduce la viscosidad del petróleo pesado.

En un aspecto de la presente descripción, se provee un proceso para optimizar la recuperación del petróleo desde un pozo petrolero, donde dicho proceso comprende reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, mediante un proceso que comprende: (i) obtener una población enriquecida de un consorcio de microbios, la cual comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983; (ii) poner en contacto dicha población enriquecida del consorcio de microbios con el petróleo en un pozo petrolero, tras lo cual el agua se pone en contacto con el petróleo en el pozo petrolero y (iii) permitir que dicha población enriquecida del consorcio de microbios prolifere en el pozo petrolero, donde dicho proceso reduce la viscosidad del petróleo pesado, donde la viscosidad del petróleo pesado se reduce en un 70-98%, lo cual conduce a una mejor recuperación del petróleo pesado desde el pozo petrolero.

En un aspecto de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, la cual comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, donde el mencionado proceso comprende: (a) inocular dicho consorcio de microbios en un medio de nutrientes, en condiciones anaeróbicas y (b) incubar dicho consorcio de microbios del paso (a) a una temperatura en el rango de 60-80°C, para obtener una mayor población de dicho consorcio de microbios.

En un aspecto de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983.

En un aspecto de la presente descripción, se provee un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983.

En un aspecto de la presente descripción, se provee un aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar en la reducción de la viscosidad del petróleo pesado en un 70-98%.

En un aspecto de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo en un 15-30%.

Estas y otras características, así como los demás aspectos y ventajas del presente tema central se comprenderán mejor con referencia a la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas. Este compendio se provee con el propósito de introducir una selección de conceptos de una manera simplificada. Este compendio no pretende identificar características fundamentales o esenciales del tema central reivindicado, ni tampoco pretende ser usado para limitar el alcance del tema central reivindicado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS

La descripción detallada se explica con referencia a las figuras adjuntas. En las figuras, el o los dígitos que se encuentran más a la izquierda de un número de referencia identifican la figura en la cual el número de referencia aparece por primera vez. En todos los dibujos, se emplean los mismos números para referirse a características y componentes similares.

La figura 1 ilustra el análisis filogenético del consorcio de microbios, de acuerdo con una realización de la

presente descripción.

La figura 2 ilustra imágenes microscópicas del consorcio de microbios, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 3 ilustra la reducción de viscosidad del petróleo pesado a diferentes temperaturas, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 4a ilustra la producción de gases del espacio de cabeza a temperaturas diferentes, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 4b ilustra la producción de ácidos grasos volátiles a temperaturas diferentes, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La Figura 5a ilustra el análisis de la composición del petróleo pesado después del tratamiento con el consorcio de microbios que contiene el microbio con el número de entrada MTCC 5983, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 5b ilustra el análisis de la composición del petróleo pesado de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 6a ilustra la reducción de viscosidad a una concentración diferente de NaCl, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 6b ilustra la producción de gases del espacio de cabeza a una concentración de NaCl diferente, de acuerdo con una realización de la presente descripción.

La figura 6c ilustra la producción de ácidos grasos volátiles a una concentración diferente de NaCl de acuerdo con una realización de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los expertos en la técnica sabrán que la presente

descripción está sujeta a otras variaciones y modificaciones distintas de aquellas descritas específicamente. También se entiende que la presente descripción incluye todas estas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todos los pasos, las características, las composiciones y los compuestos referidos a esta memoria descriptiva o indicados en ella, ya sea de manera individual o colectiva y todas y cualesquiera combinaciones de cualquiera de estos pasos o características citados.

Definiciones:

Por cuestiones de conveniencia, antes de continuar con la descripción de la presente descripción, se recogen aquí ciertos términos que se utilizan en esta memoria descriptiva, además de ejemplos. Estas definiciones deben interpretarse a la luz del resto de la descripción y entenderse como lo haría una persona idónea en la técnica. Pese a que los términos que se emplean en este documento tienen los significados reconocidos y sabidos por los expertos en la técnica, por cuestiones de conveniencia e integridad, los términos en particular y sus significados se explican a continuación.

Los artículos "un/a" y "el/la" se usan para referirse a uno o más de uno (es decir, por lo menos a uno) del objeto gramatical del artículo.

Los términos "comprende/n" y "que comprende/n" se utilizan en un sentido inclusivo y abierto, lo cual significa que es posible incluir elementos adicionales. En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, el término "comprenden" y sus variaciones, tales como "comprende" y "que comprende/n", deberán interpretarse como que implica la inclusión de un elemento o de un paso o de un grupo de elementos o de pasos indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, paso o grupo de elementos o de

pasos.

El término "que incluye/n" se emplea para referirse a "que incluye/n aunque no taxativamente". "Que incluye/n" y "que incluye/n aunque no taxativamente" se utilizan como sinónimos. El término "agua de la formación" empleada aquí se refiere a una muestra recogida directamente de un pozo petrolero, que incluye agua, petróleo y microbios indígenas. El término petróleo pesado significa un tipo de petróleo crudo que no fluye fácilmente. Se lo denomina "pesado" debido a su densidad o gravedad específica, que supera a la del petróleo crudo ligero. El petróleo crudo pesado se ha definido como cualquier petróleo líquido con una gravedad API [*American Petroleum Institute*, Instituto Americano del Petróleo] inferior a 20°, lo cual significa que su gravedad específica es mayor que 0.933. Convencionalmente, el petróleo pesado tiene una viscosidad que varía de 100 cp a 10,000 cp. Los petróleos pesados típicamente tienen bajas relaciones hidrógeno a carbono, alto contenido de asfaleno, azufre, nitrógeno, y metales pesados, así como también, mayores números de ácidos. El petróleo pesado es una mezcla compleja de hidrocarburos que no fluye con facilidad. El petróleo pesado es un compuesto de hidrocarburos, aunque tiene deficiencias de hidrógeno, en comparación con los hidrocarburos más ligeros.

El término "asfaltenos" se refiere a sustancias moleculares que se encuentran en el petróleo crudo, junto con resinas, hidrocarburos aromáticos y saturados. Los asfaltenos básicamente consisten en carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre, así como también, cantidades traza de vanadio y níquel. La relación C:H es de aproximadamente 1:1.2, dependiendo de la fuente de asfaleno. Los asfaltenos se definen, operacionalmente como el componente insoluble en

n-heptano (C_7H_{16}), soluble en tolueno ($C_6H_5CH_3$) de un material carbonáceo, tal como petróleo crudo, bitumen o carbón. Los asfaltenos han demostrado tener una distribución de masas moleculares comprendida en el rango de 400 amu a 1500 amu, aunque el promedio y los valores máximos son difíciles de determinar debido a la agregación de las moléculas en solución.

El término "poliaromáticos" o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, *polycyclic aromatic hydrocarbons*, también conocidos como hidrocarburos poliaromáticos) se refiere a hidrocarburos que están compuestos por múltiples anillos aromáticos; que contienen más de un sistema de anillos aromáticos, en especial, varios anillos de esta índole fusionados entre sí.

El término "petróleo crudo" se refiere a un producto de petróleo natural, sin refinar, compuesto por depósitos de hidrocarburos. El petróleo crudo se puede refinar para producir productos utilizables, tales como gasolina, diésel y diversas formas de petroquímicos.

El término tensioactivos biológicos se refiere a diversos grupos de moléculas/compuestos químicos activadores de superficies, sintetizados por microorganismos. Estos compuestos anfifílicos se producen en las superficies vivas, principalmente sobre las superficies de las células microbianas o excretadas extracelularmente.

El término "fracción más pesada de hidrocarburo" se refiere a las fracciones de petróleo que tienen mayor peso molecular.

El término "viscosidad de petróleo crudo" se refiere a la resistencia del petróleo crudo al flujo y esfuerzo cortante debidos a la gravedad. Los principales factores que afectan la viscosidad son la composición del petróleo, la

temperatura, los gases disueltos y la presión.

El término "recuperación mejorada del petróleo" se refiere a una mayor recuperación del petróleo desde un reservorio, lo cual no sería posible con los medios convencionales para la extracción de hidrocarburos. La recuperación mejorada del petróleo (EOR, *enhanced oil recovery*) se usa para aumentar la recuperación del petróleo en las formaciones rocosas que tienen hidrocarburos de todo el mundo. Básicamente existen tres tipos de métodos EOR: térmico, químico/polimérico y por inyección de gas. Sin embargo, en los reservorios de petróleo muy pesado que contienen grandes cantidades de agua móvil, las técnicas convencionales de EOR son incapaces de movilizar el petróleo con eficiencia y de producirlo y, por lo tanto, los reservorios permanecen improductivos o producen a un nivel inferior al deseable.

El término "movilidad del petróleo" se refiere a la relación de la permeabilidad eficaz al flujo de petróleo a su viscosidad.

El término petróleo residual se refiere al "líquido que queda en un reservorio de petróleo en el momento del agotamiento". La saturación del petróleo residual (SOR, *residual oil saturation*) es la unidad para cuantificar el petróleo residual. El valor de la saturación residual depende de la eficiencia de barrido vertical y horizontal, de la heterogeneidad del sistema geológico y de la eficiencia del desplazamiento microscópico. La eficiencia del desplazamiento microscópico depende básicamente de las fuerzas capilares, pero también de las fuerzas viscosa y gravitacional.

El término "porosidad" se refiere a los espacios minúsculos en la roca que alojan al petróleo o al gas. El término "permeabilidad" es una característica que permite que

el petróleo y el gas fluyan a través de la roca.

Las relaciones, las concentraciones, las cantidades y los demás datos numéricos presentados en este documento están en formato de rango. Debe entenderse que este formato de rango se usa meramente por cuestiones de conveniencia y brevedad y que debe interpretarse con flexibilidad, no solo para incluir los valores numéricos explícitamente enumerados como los límites del rango, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subrangos comprendidos dentro de dicho rango, como si cada valor numérico y subrango se hubiera mencionado explícitamente. Por ejemplo, un rango de temperaturas variable entre aproximadamente 70°C y alrededor de 100°C debe interpretarse como que incluye no solo los límites expresamente enumerados desde aproximadamente 70°C hasta alrededor de 100°C, sino que también incluye los subrangos, tales como 80°C a 90°C, 85°C a 98°C, etc., Casi como también las cantidades individuales, incluso las cantidades fraccionadas, comprendidas en los rangos especificados, tales como 92°C, 80.6°C y 91.3°C, por ejemplo.

Como se ha discutido anteriormente, el proceso de recuperación del petróleo basado en microbios es una metodología que tiene varias ventajas exclusivas que lo convierten en una alternativa económicamente atractiva respecto de otros procesos para la recuperación mejorada del petróleo. La presente descripción se refiere a un método en el que la viscosidad del petróleo pesado se reduce mediante un consorcio de microbios que contiene microbios que tienen el número de entrada MTCC 5983, facilitando así la mejor recuperación del petróleo pesado.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en

un pozo petrolero, donde dicho proceso comprende: (a) obtener una población enriquecida de un consorcio de microbios, la cual comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983; (b) poner en contacto dicha población enriquecida del consorcio de microbios con el petróleo en un pozo petrolero, tras lo cual el agua se pone en contacto con el petróleo en el pozo petrolero y (c) permitir que dicha población enriquecida del consorcio de microbios prolifere en el pozo petrolero, donde dicho proceso reduce la viscosidad del petróleo pesado.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, donde dicho proceso comprende: obtener una población enriquecida de un consorcio de microbios, la cual comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983; inyectar una predescarga del medio de nutrientes; inyectar dicha población enriquecida del consorcio de microbios en un pozo petrolero, permitiendo que dicha población enriquecida del consorcio de microbios prolifere en el pozo petrolero, luego de lo cual se realiza la inyección de la posdescarga del medio de nutrientes, seguida por la persecución del agua, donde dicho medio de nutrientes comprende al menos un nutriente mineral, extracto de levadura, al menos una fuente de carbono y al menos un elemento traza o sus sales.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la viscosidad del petróleo pesado se reduce en un 70-98%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en

un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la viscosidad del petróleo pesado se reduce en el 98%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que el pozo petrolero tiene una temperatura en el rango de 60-80°C.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que el pozo petrolero tiene una temperatura en el rango de 70°C.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que el pozo petrolero tiene una temperatura de 70°C, y en el que la viscosidad del petróleo pesado se reduce en el 98 %.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad de petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la reducción de la viscosidad del petróleo pesado se mide después de 10 días de haber inyectado el consorcio de microbios en el pozo petrolero.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la viscosidad del petróleo pesado se reduce mediante el consorcio de microbios, degradando las fracciones más pesadas de los hidrocarburos del petróleo.

En una realización de la presente descripción, se provee

un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que las fracciones más pesadas de los hidrocarburos del petróleo comprenden poliaromáticos y asfaltenos.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que los poliaromáticos se seleccionan del grupo que consiste en naftaleno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h] antraceno y combinaciones de estos.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del benzo[k]fluoranteno se ubica en el rango de 92 a 98%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del benzo[k]fluoranteno es del 96.57%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del benzo[a]antraceno se ubica en el rango del 91 al 97%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del benzo[a]antraceno es

del 94.9%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del benzo[b]fluoranteno se ubica en el rango de 88 a 96%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del benzo[b]fluoranteno es del 92.18%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del dibenzo[a,h]antraceno es en el 74 al 80%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación de dibenzo[a,h]antraceno es del 77%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del pireno se ubica en el rango de 70-76%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del pireno es del 73.75%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en

un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del naftaleno se ubica en el rango de 59 a 67%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del naftaleno es del 63%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del criseno se ubica en el rango del 52 al 58%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la degradación del criseno es del 51.3%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que la viscosidad del petróleo pesado se reduce al degradar el contenido de asfaleno presente en el petróleo.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, en el que la degradación del asfaleno se ubica en el rango de 40-70%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, en el que la degradación del asfaleno es del 43.3%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para optimizar la recuperación del petróleo desde

un pozo petrolero, donde dicho proceso comprende reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, mediante un proceso según se describe en el presente documento.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para optimizar la recuperación del petróleo desde un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que dicho proceso mejora la recuperación del petróleo en un 15-30%.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para optimizar la recuperación del petróleo desde un pozo petrolero, según se describe en el presente documento, en el que dicho proceso mejora la recuperación del petróleo en el 24.8% de la SOR.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, la cual comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, donde dicho proceso comprende: a) inocular dicho consorcio de microbios en un medio de nutrientes, en condiciones anaeróbicas y b) incubar dicho consorcio de microbios del paso (a) a una temperatura en el rango de 60-80°C, a fin de obtener una mayor población de dicho consorcio de microbios.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que la inoculación del consorcio de microbios en el medio de nutrientes preparado en el agua de la formación.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que dicho medio de nutrientes tiene un pH en el rango de 6.5-7.5.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que dicho medio de nutrientes comprende al menos un nutriente mineral, extracto de levadura, al menos una fuente de carbono y al menos un elemento traza o sus sales.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, donde dicho al menos un nutriente mineral se selecciona del grupo que consiste en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y combinaciones de estos.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que dicha única fuente de carbono como mínimo es petróleo crudo.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que el mencionado único elemento traza como mínimo o sus sales se selecciona del grupo que consiste en ácido nitrilotriacético (sal sódica), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2/\text{CoSO}_4$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Alk}(\text{SO}_4)_2$, H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y combinaciones de estos.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que dicha concentración de oxígeno en condiciones anaeróbicas se ubica en el rango de 0.1-0.4 ppm.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de

microbios, según se describe en el presente documento, en el que la incubación del consorcio de microbios en el medio de nutrientes se prepara a una temperatura en el rango de 60-80°C.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que la incubación del consorcio de microbios en el medio de nutrientes se realiza a una temperatura en el rango de 70°C.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que dicho proceso da como resultado un aumento en la población de dicho consorcio de microbios.

En una realización de la presente descripción, se provee un proceso para aumentar la población de un consorcio de microbios, según se describe en el presente documento, en el que el proceso se repite al menos tres veces, con un intervalo de 21-30 días, a fin de obtener un consorcio estable de microbios. No obstante, después de la optimización de los nutrientes, el tiempo del proceso es de 10 días de incubación o producción de metabolitos.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio aislado tiene similitud de secuencia con el género *Morella* sp. CF4.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, en el que dicho

microbio tiene forma de varilla.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, donde dicho microbio tiene un tamaño tal que su ancho varía en el rango de 0.3-0.5 μm y su largo, en el rango de 0.5-2.5 μm .

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio es gram-positivo.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio no es móvil.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio no es patogénico.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio no es tóxico, no es virulento y es seguro para usar en este campo.

En una realización de la presente descripción, se provee un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un 70-99%.

En una realización de la presente descripción, se provee

un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado en el 98%.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado en el rango de 70-98%, a una temperatura en el rango de 60-80°C.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado en el 98% a una temperatura de 70°C.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado, según se describe en el presente documento, donde la reducción de la viscosidad se mide después de un mes de incubación de dicho microbio aislado en el petróleo.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio reduce la viscosidad del petróleo pesado al degradar las fracciones más pesadas de los hidrocarburos del petróleo,

mediante un proceso según se describe en el presente documento.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, con el fin de usarlo para reducir la viscosidad del petróleo pesado, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio reduce la viscosidad del petróleo pesado, mediante la degradación del contenido de asfalteno del petróleo.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo en un 15-30%.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo en el 24.8%, en la Sor.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en el que el petróleo se recupera inundando el pozo petrolero con una población de dicho microbio, inyectando después agua en el pozo petrolero, en donde toda la solución se empuja hacia los poros del pozo petrolero, permitiendo que el microbio prolifere, con lo cual el petróleo se disocia.

En una realización de la presente descripción, se provee

un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en donde la proliferación de microbios genera metabolitos tales como gases, ácidos, tensioactivos biológicos, disolventes biológicos que, en última instancia, contribuyen a movilizar el petróleo para que salga del pozo.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en el que dicho microbio produce tensioactivos biológicos que actúan para reducir la tensión interfacial entre el petróleo, el agua y las interfaces rocosas, disociando así el petróleo.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, donde la tensión interfacial se reduce entre 23 y 12 mN/m.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de optimizar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en el que el microbio produce dióxido de carbono y crea presión localizada en los poros de la roca núcleo y, de este modo, contribuye a la expansión del

petróleo, barriéndolo así del pozo petrolero.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en donde la cantidad de dióxido de carbono producida es de 22-27% en el medio optimizado.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, donde el microbio produce ácidos grasos volátiles que solubilizan el depósito en la garganta del poro, para mejorar la porosidad y así, la permeabilidad de la roca.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en donde la cantidad de ácidos grasos volátiles producidos es de 2500-3100 mg/l.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, donde los ácidos grasos volátiles comprenden ácido acético y ácido butírico.

En una realización de la presente descripción, hay un

microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprenden un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en donde la cantidad de acético ácido producido es de 1800-2300 mg/l.

En una realización de la presente descripción, se provee un microbio aislado que tiene el número de entrada MTCC 5983 o un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983, para usar con el fin de mejorar la recuperación del petróleo, según se describe en el presente documento, en donde la cantidad de ácido producido es de 700-780 mg/l.

Aunque el tema central se ha descrito brindando detalles considerables con referencia a ciertas realizaciones sobre él, son posibles otras realizaciones.

EJEMPLOS

La invención se ilustrará ahora con ejemplos de trabajo, los cuales están destinados a ilustrar el trabajo de la descripción y no deben interpretarse restrictivamente, como que implican limitaciones en el alcance de la presente descripción. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Pese a que los métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos se pueden usar en la práctica de los métodos y de las composiciones detallados, aquí se describen los métodos, los dispositivos y los materiales ejemplares. Debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y a las condiciones experimentales particulares que se describen, dado que tales métodos y condiciones pueden variar.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Muestreo del consorcio de microbios

El yacimiento de Becharaji es una de las principales franjas de petróleo pesado. Se ubica al oeste de Mehsana Horst, en el Bloque Norte de la cuenca de Cambay. Produce desde las arenas productivas de Kalol de la era del Eoceno Medio. El yacimiento se descubrió en 1987. El petróleo y el fluido de la formación usados en este estudio se recogieron de los reservorios situados en cinco pozos productores de petróleo diferentes en el yacimiento de Becharaji, a saber B#143, B#136, B#90, B#177 y B#138. El reservorio empleado para recoger la muestra tenía una temperatura de fondo de sondeo de 70°C, con una salinidad de 7500-9000 ppm y > 80% de corte de agua. El petróleo es pesado con respecto a la viscosidad, que varía en el yacimiento de 948 cp a 4474 cp, a 55°C.

Enriquecimiento del consorcio de microbios: el aislamiento de microbios a partir del fluido de la formación se llevó a cabo mediante una técnica de cultivos para el enriquecimiento en un medio salino mínimo (MSM, *minimal salt medium*). La composición del medio MSM (gramos por litro) era: MgSO₄.7H₂O, 0.5 g; KNO₃, 0.5 g; (NH₄)₂HPO₄, 0.05 g; KH₂PO₄, 1.0 g; K₂HPO₄, 1.0 g; extracto de levadura, 0.5 g; 10 ml de solución de elementos traza (ácido nitrilotriacético (sal sódica), 1.5g; MgSO₄.7H₂O, 3g; MnSO₄.2H₂O, 0.5g; NaCl, 1.0 g; FeSO₄.7H₂O, 0.1 g; CoCl₂/ CoSO₄, 0.1 g; CaCl₂.2H₂O, 0.1 g; ZnSO₄, 0.1 g; CuSO₄.5H₂O, 0.01 g; Alk (SO₄)₂, 0.01 g; H₃BO₃, 0.01 g; Na₂MoO₄.2H₂O, 0.01 g y 1.0 ml de solución de vitaminas (biotina, 2 mg; ácido fólico, 2 mg; HCl de piridoxina, 10 mg; tiamina-HCl, 5 mg; riboflavina, 5 mg; ácido nicotínico, 5 mg; DL-pentotenato de calcio, 5 mg; ácido p-aminobenzoico, 5 mg;

ácido lipoico, 5 mg; vitamina B12, 0.1 mg). El pH se ajustó con 1 mol/L de NaOH. Se añadió resazurina como indicador de oxígeno (la resazurina tiene un coloro rosado en los potenciales redox de -150 mV aproximadamente). El medio se hirvió bajo una corriente de gas nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto. Después de enfriar bajo rociado constante de nitrógeno, 45 ml del medio se dispersaron en botellas de 100 mL con suero que ya contenía 0.5 g del petróleo crudo recogido de los respectivos cinco pozos petroleros. Las botellas individuales se cerraron herméticamente con tapones de caucho de butilo y se esterilizaron a 121°C y 15 psi durante 20 minutos. El proceso de enriquecimiento se efectuó inoculando una alícuota de 5 mL del fluido de la formación aislado de los diferentes pozos, en 45 mL de los medios, por triplicado, para los 5 pozos. Todas las botellas inoculadas con el suero se incubaron a la temperatura del reservorio (70°C). Se llevaron a cabo tres ciclos de enriquecimiento para obtener un consorcio estable, con un intervalo de 21-30 días. Las botellas con suero no inoculadas que contenían los medios MSM se trataron como grupo de control, que se preparó para un análisis comparativo.

Análisis de la composición de petróleo: se analizó la presencia de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre (CHNS, *carbon, hydrogen, nitrogen, sulfur*) en el petróleo, siguiendo las pautas de la American Public Health Association (APHA, Asociación Americana de Salud Pública). Se extrajo el total de hidrocarburos del petróleo (TPH, *total petroleum hydrocarbon*) del petróleo, según lo describen Mishra y colaboradores (2001a). El TPH extraído (0.2-0.5 g) se disolvió en n-heptano y se separó en fracciones solubles e insolubles, según la metodología SARA (Saturados, Aromáticos, Resina y Asfalteno) IP 143/84(1989). La fracción soluble se

distinguió luego en fracciones de alcanos y aromáticos, mediante su carga en una columna de gel de sílice y la elución con hexano, y benceno, respectivamente. La fracción de asfalto se eluyó con una mezcla de cloroformo y metanol. La concentración para todas las fracciones (solubles e insolubles) se determinó gravidimétricamente (Mishra y colaboradores 2001b) tras la evaporación de los disolventes. Las fracciones de alcanos y aromáticos se analizaron nuevamente por cromatografía gaseosa (GC, *gas chromatography*, Hewlett Packard 5890 Serie II).

Análisis fisioquímico del fluido de la formación: para enriquecer los microbios *in situ*, se recogieron muestras del fluido de la formación de los pozos y se colocaron en botellas con suero anaeróbico esterilizadas, durante el mes de abril de 2011. Las botellas se almacenaron y despacharon en una atmósfera de argón rumbo al laboratorio, para continuar con el análisis. Las muestras en el lugar se analizaron para determinar su pH y conductividad. El análisis fisioquímico del petróleo pesado y del fluido de la formación se realizó según las pautas del API (American Petroleum Institute). El contenido de metales pesados en el fluido de la formación, incluidos el arsénico, el cadmio, el cromo, el cobre, el plomo y el mercurio, se analizaron según el método APHA, con límites de detección de 0.01, 0.01, 0.01, 0.02, 0.01 y 0.0005 mg/l respectivamente. También se hizo un seguimiento de la presencia de iones inorgánicos, tales como calcio, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato (tabla 2). Se filtraron otros 500 ml de fluido de la formación a través de un filtro Millipore de 0.2 μm de tamaño de poro y 45 mm de diámetro, lo que se utilizó para el aislamiento del ADN, para el posterior análisis del perfil de la comunidad de 16S rDNA.

Medición de la viscosidad del petróleo: la medición de

la viscosidad se llevó a cabo usando un viscosímetro de placa cónica (reómetro Brookfield-Programmable R/S+ CPS+). El sistema se calibró con un aceite estándar (polidimetilsiloxano) que tenía una viscosidad conocida de 498 cP a 25 °C. Aproximadamente 4 ml del petróleo extraído se colocó entre la copa con la muestra y un husillo cónico. Este montaje se hizo girar a una velocidad preestablecida de 0.3-2.0 rpm. Cuando el torque ejercido en el husillo por el petróleo pesado fue del 50-100 % de la escala completa, se registró el valor de la viscosidad exhibido en el panel digital LCD. La velocidad de rotación y el torque ejercido son proporcionales entre sí. Los datos de la viscosidad se registraron a 70 °C, donde la muestra exhibía signos de fluido newtoniano. Se mantuvo una temperatura constante durante la medición de la viscosidad usando un baño de agua caliente circulante (Heto CBN 18-50/HMT 200), con una precisión de ± 0.1 °C. Las mediciones de la viscosidad para todas las muestras se llevaron a cabo en diez momentos diferentes, con un intervalo de 60 segundos. Esto se repitió tres veces y se tomó nota de los valores promedio de los tres datos medidos de la viscosidad.

Métodos analíticos: la estimación para la producción de gas se realizó en un cromatógrafo de gas (modelo GC-7890A, Agilent Ltd. EE. UU.), equipado con una columna de acero inoxidable empaquetada con tamiz molecular (2 m X 2 mm, id NUCON, INDIA) y un detector de conductividad térmica (TCD, *thermal conductivity detector*). El gas argón, con un índice de flujo de 5 ml/min, con 3 ml/min de nitrógeno fue el gas de compensación. Las temperaturas operativas del horno, del puerto de inyección y del detector fueron de 50, 100 y 150 °C respectivamente. Antes del análisis de las muestras de cultivo, se preparó una curva de calibración para el

hidrógeno, nitrógeno, metano y dióxido de carbono, y se halló que el valor R² era de 0.998.

Las concentraciones de ácidos grasos volátiles (VFA, *volatile fatty acids*) C₂-C₆ en la fase líquida se analizó con GC 7890A Agilent Ltd. EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama y una columna DB-WAX etr (30 m × 530 µm × 1 µm). La temperatura del horno era de 140 °C, con rampas de temperatura de 1 °C por minuto hasta 160 °C. Las temperaturas del inyector y del detector eran de 220 y 230 °C. Se usó helio como gas portador. Antes de ejecutar las muestras, el método VFA se calibró inyectando VFA convencionales con concentraciones variables. Se preparó la curva de calibración de cada VFA y el valor R² fue de 0.998.

Las concentraciones de los disolventes (etanol, butanol y propanol, isopropanol) en el filtrado de cultivo se analizaron mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, serie Agilent 1100, EE. UU.) equipada con una columna AminexR HPX-87H, (300 mm × 7.8 mm) (BIO RAD, CA, EE. UU.) usando H₂SO₄ 0.005 mM como la fase móvil, a un índice de flujo de 0.6-0.9 ml durante 21 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo en 80 °C. Se identificaron metabolitos intermedios cotejando los tiempos de retención con los estándares auténticos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO números de catálogo 45730; 19440; 33538; 33553; 45960). Se obtuvo la curva de calibración para todos los estándares, con un R² de aproximadamente 0.998.

Se empleó un GC 6890 N (Agilent Technologies) equipado con una columna capilar HP-5 (5 % de fenilmetil-siloxano) (30 m × 320 µm × 0.5 µm) y helio (2 ml/min), como gas portador, con una tasa de división de 22.6 y un flujo de división de 74.5 ml/min para el análisis de las fracciones alifáticas y aromáticas. Las temperaturas del inyector y del detector

(detector de ionización de llama) fueron de 280 y 300 °C, respectivamente. El horno se programó para un aumento de temperatura de 80 °C a 300 °C, con un incremento de 5 °C /min y se mantuvo después durante 30 minutos a esta temperatura. Se usaron los estándares auténticos para los alifáticos (C14-C38) y aromáticos (naftaleno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y dibenzo[a,h] antraceno) como referencia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, números de catálogo 176044-1G; 0442456; 456292; 275336; 392251; ERB-005; 40072). Se preparó la curva de calibración de cada estándar, y el valor R² fue de 0.998.

Los cambios de alifáticos, aromáticos, resinas y asfalteno de las muestras de petróleo de Becharaji antes y después de los tratamientos con el MTCC 5983 se caracterizaron por FT-IR [*Fourier transform infrared spectroscopy*, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier]. Para resumir, aproximadamente 10 mg de bromuro de potasio en polvo (KBr) se comprimieron a alta presión para formar un disco. Luego, se roció 1 mg de la muestra de manera uniforme sobre la superficie de este disco y después de analizó en un espectrómetro Nicolet 20SXC, equipado con un detector de DTGS, que recogía 1024 imágenes por muestra, con una resolución de 4 cm⁻¹. Todos los espectros se registraron en una escala de transmitancia lineal con una región de medición de 4000-400 cm⁻¹. Los espectros resultantes se normalizaron a un valor equivalente.

Producción y extracción de tensioactivo biológico: la producción de tensioactivo biológico se llevó a cabo en un medio MSM, se precipitó mediante un tratamiento con ácido (HCl 1N) y se extrajo usando un volumen igual de cloroformo: mezcla de metanol. La fase orgánica se recuperó y el extracto

de tensioactivo biológico sin procesar se secó al vacío, a 45°C. La caracterización del tensioactivo biológico extraído se realizó mediante la prueba de Molish y Ramnosa. La presencia del grupo de carbohidratos en el tensioactivo biológico extraído se determinó por la prueba de Molisch. Se llevó a cabo la prueba de ramnosa, para verificar la presencia de ramnosa en el tensioactivo biológico.

Determinación de tensión interfacial: se llevó a cabo la prueba de colapso de la gota para el MTCC 5983, a fin de determinar la tensión interfacial utilizando el método de elevación capilar. Para medir la tensión interfacial, se transfirieron 5 ml del sobrenadante del caldo de cultivo a una bandeja de vidrio que se sumergió en un anillo de platino. A modo de control, se usó un caldo sin inocular, y la tensión interfacial se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\lambda = (r \times h \times d \times g) / 2$$

En la que λ = tensión interfacial (mN/m); d = densidad (g/ml); g = gravedad (980 cm/s²); r = radio capilar (0.025 cm); h = altura [*height*] de la columna líquida (cm).

Caracterización de la comunidad microbiana: se extrajo el ADN genómico total a partir del consorcio bacteriano (que representaba muchas bacterias diferentes del grupo), usando el kit de ADN del suelo UltraClean (Mo Bio, Inc.), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El ADN extraído se usó como plantilla y se amplificó mediante PCR el gen 16S rRNA del DNA con los cebadores que tienen la ID. DE SEC. NO. 1 y la ID. DE SEC. NO. 2. La ID. DE SEC. NO. 1 ilustra la secuencia del cebador directo y la ID. DE SEC. NO. 2 ilustra la secuencia del cebador inverso.

Para resumir, se usaron 50 ng/ μ l de ADN como plantilla en 30 μ l de reacción de PCR que contenía MgCl_2 2 mM (Sigma, St. Louis, MO), 0.50 μ M de cebadores directos e inversos, 0.08 U/ μ l de Taq polimerasa, 400 ng/ μ l de albúmina de suero bovino y 0.25 mM de cada trifosfato desoxinucleósido (Sigma, St. Louis, MO). Las condiciones de PCR para los cebadores bacterianos fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C, durante 30 segundos, 56 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 1 minuto, a lo cual siguió una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR resultantes (~1500 bp) se purificaron con gel usando un kit de extracción con gel QIAGEN (QIAGEN, Valencia, CA) y el vector pGEM-T (PROMEGA, EE. UU.) se clonó según las instrucciones del fabricante. Los clones obtenidos de esta manera representan una biblioteca, en la que cada uno tiene una secuencia diferente del gen 16SrRNA, dado que la plantilla de ADN usada para la amplificación del 16SrRNA se obtuvo a partir de un consorcio bacteriano. El secuenciamiento de clones positivos (96 de cada biblioteca) portadores de los insertos se efectuó mediante el kit de secuenciamiento cíclico BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciamiento directa e inversa se ensamblaron en reacciones separadas, usando los cebadores M13F y M13R respectivamente. Los 10 μ l de la mezcla de reacción consistían en 1 μ l del producto de PCR purificado, 2 μ l de la mezcla lista para la reacción BigDye, 1 μ l del tampón de secuenciamiento Big Dye y 1 μ l de los cebadores M13F/M13R (25 μ M). Las condiciones de ciclización para la reacción de amplificación incluían un paso de desnaturalización inicial a 96°C durante 1 minuto, a lo cual siguieron 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 20 segundos, con recocido a 56°C durante 20 segundos

y elongación a 60°C durante 4 minutos. A esto siguió un paso de extensión final a 60°C durante 1 minuto. La reacción de PCR de secuenciamiento se purificó usando el kit Qiagen-DyeEx 96, de acuerdo con el protocolo del fabricante y finalmente, se resuspendió en 20 µl de Hi-Di Formamida (PE Applied Biosystems, EE. UU.). Los productos secuenciados por ciclos se analizaron después en un analizador genético ABI prism 310 (PE Applied Biosystems). Para identificar el consorcio, las secuencias obtenidas de cada clon de la biblioteca se sometieron a una búsqueda BLAST en la base de datos de NCBI.

Prueba de patogenicidad del MTCC 5983: el MTCC 5983 se estudió para determinar la patogenicidad por toxicidad oral aguda. En el experimento de patogenicidad, se consideraron 40 ratones (20 machos y 20 hembras) para los grupos de dosis: de control y de prueba. Se administró el cultivo de microbios (MTCC 5983) (1 ml por ratón) una vez por sonda a los ratones. A estos se los privó de alimento 3-4 horas y 2 horas después de la administración del cultivo. Al final del período de observación, los animales experimentales que sobrevivieron fueron sacrificados. Se realizó la necropsia macroscópica y todos los animales fueron examinados cuidadosamente para la detección del cultivo bacteriano.

Rendimiento del MTCC 5983 bajo estrés abiótico: también se determinó la capacidad reductora de la viscosidad del MTCC 5983 a diferentes concentraciones de sal (0, 0.5, 1, 2 % de NaCl) y a distintas temperaturas (60, 70, 80°C). También se usó el medio MSM suplementado con 1 % de petróleo crudo como fuente de carbono para estas condiciones. En el caso de los estudios de las sales, las incubaciones se llevaron a cabo a 70°C. Para cada uno de los parámetros estudiados, se analizó la producción del gas de espacio de cabeza total. También se estableció un conjunto de control para cada condición. Los

experimentos se realizaron por triplicado.

Prueba de inundación del núcleo de MTCC 5983: se realizó un experimento de inundación del núcleo en una columna de arena preparada a partir de la arena de Becharaji, para probar la eficacia del consorcio MTCC 5983 para estimar la recuperación incremental del petróleo.

El paquete de arena se llenó con arena del reservorio de Becharaji, y el experimento se ejecutó a una temperatura de 70 grados Celsius. La estrategia general consistió en las siguientes etapas: limpieza de las arenas del reservorio: petróleo y agua de la formación; secado de la arena; preparación del paquete de arena usando la arena limpia y seca, como se indicó más arriba; determinación de la permeabilidad; evacuación de la columna de arena, seguida por la saturación con el agua de la formación; determinación del volumen del poro y de la porosidad; inundación con agua de la formación; inundación con petróleo; envejecimiento para determinar la restauración de la humectabilidad; inundación en una etapa secundaria, que implica la inundación con agua de la formación y la inyección de la mezcla de nutrientes y microorganismos a la columna de arena; incubación: incubación en condiciones estáticas, a 70° C durante 10 días; inyección del agua de la formación que inunda la columna de arena, lo cual da como resultado la recuperación del petróleo por efecto de los microorganismos y de los metabolitos generados, lo cual corresponde a la recuperación microbiana mejorada del petróleo. Las propiedades básicas de la columna de arena son las siguientes: largo de la columna de arena, 20 cm; diámetro, 2.835 cm; superficie, 6.314 cm²; porosidad, 41.2 %; permeabilidad 4584 md, salinidad, 9126.62 mg/l; temperatura, 70°C; volumen total de poros, 52 cc; volumen de poros de los hidrocarburos (HCPV, *hydrocarbon pore volume*) 38.6 cc. Para

la inundación, se usaron el agua de la formación con MTCC 5983 y petróleo. El componente del experimento de inundación comprendía: celda del paquete de arena, bombas para la inyección controlada de la presión, horno, sistemas de medición de la presión y reguladores de presión. El sistema del paquete de arena se colocó a la temperatura del reservorio, 70°C. Se usaron transductores de presión para medir la presión diferencial en los extremos del paquete. Se emplearon cilindros de transferencia para mantener los fluidos (agua, petróleo, medio, cultivo) y transferirlos a la columna de arena. Los fluidos que salían del paquete se recuperaron. El agua de la formación se desplazó a través del paquete, a una velocidad de flujo de la inyección de 5 ml/h. Para lograr la saturación, se inyectaron 0.4 volúmenes de poro del agua de la formación. El paquete de arena se saturó con petróleo pesado de Bechraji con una gravedad API igual o superior a 10 grados. Se inyectaron 1.5 volúmenes porosos de petróleo, a un caudal de 5 ml/h, y se midieron los volúmenes de salmuera recuperada y el residual de petróleo en el núcleo. Todos los pasos de recuperación se llevaron a cabo a temperaturas de 70° C en el medio anaeróbico, permitiendo la estabilización del sistema.

Inundación con agua, utilizando el agua de la formación e inyección del cultivo con nutrientes: se realizó la recuperación del petróleo inyectando el fluido de la formación a una velocidad de 5 ml/hora y 70° C. La recuperación se completó sin más petróleo detectado en la salida. Tras completar el proceso de inundación con agua, se preparó el medio mineral y se añadió el inóculo del cultivo MTCC 5983 como se indica en la descripción del proceso biotecnológico de la presente descripción. El inóculo se inyectó a una velocidad de 5 ml/hora, un volumen de poro.

Incubación: una vez que el paquete estuvo saturado con los medios de cultivo y los microorganismos, la inyección se detuvo y el sistema se confinó a 70° C durante 10 días. En el transcurso de este período, los microorganismos crecieron y produjeron metabolitos en la columna de arena que son útiles para mejorar la movilidad del petróleo y por ende, su recuperación.

Etapa terciaria: recuperación microbiana mejorada del petróleo. Después del período de incubación de 10 días, se inyectó el agua de la formación para recuperar el petróleo. La velocidad de flujo se incrementó gradualmente de 5 a 20 ml/h. Se evaluó la recuperación del petróleo.

Ejemplo 2

Resultados

Caracterización de la comunidad microbiana: el análisis de secuencias de los clones usando BLAST, ubicó todas las secuencias en el género *Morella* sp. CF4, con una similitud que variaba de 94 a 97 % (números de entrada del NCBI KF500024-KF500028). Como se observa en la figura 1, el análisis filogenético con MEGA sugiere que el consorcio representa cepas que forman un linaje distinto respecto de las cepas conocidas del género *Morella*. Además, también refleja que la similitud entre los clones es altamente variable, en un rango que comienza tan bajo como en 46 y llega hasta el 92 %. Se purificó una de las cepas, su gen 16SrRNA se secuenció y la cepa aislada se sometió al MTCC con un número de entrada MTCC5983. Las células bacterianas del consorcio se observaron microscópicamente, lo cual reveló bastones, 0.3-0.5 µm y se presentaban individualmente, en pares o en cadenas, como se observa en la figura 2. Eran gram-positivas y no móviles. No se observaron ni flagelos ni fibrillas polares con la microscopía electrónica por barrido.

Patogenicidad de MTCC5983: la toxicidad oral aguda en los ratones no indicó la presencia de cultivos bacterianos vivos en ninguno de los órganos, por lo que el cultivo fue no tóxico, no virulento y seguro para usar en el campo.

Análisis de la composición de petróleo: se halló que los diversos componentes de petróleo estaban constituidos por 42 ± 1.93 % de alifáticos, 27 ± 1.02 % de aromáticos, 10 ± 1.83 % de asfalteno, 21 ± 1.0 % de resinas. El análisis de la composición de petróleo es indicativo de la naturaleza pesada del petróleo de Bechraji. El petróleo tenía una viscosidad de 668 cp a 70°C. El análisis de CHNS mostró la presencia de carbono (84.57 %), hidrógeno (11.52 %), nitrógeno (0.225 %) y azufre (0.20 ppm), según se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis de la composición del petróleo pesado de Bechraji

Parámetro	Valor
Alifáticos (%)	42 ± 1.93
Aromáticos (%)	27 ± 1.02
Asfalteno (%)	10 ± 1.83
Resinas (%)	21 ± 1.0
Densidad a 60 °F	0.9795
Gravedad API	12.82
Viscosidad a 70°C	650 – 1000 cp
Carbono (%) en masa	84.57
Hidrógeno (%) en masa	11.52
Nitrógeno (%) en masa	0.225
Azufre (ppm)	0.20

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del agua de la formación recogida de los yacimientos petrolíferos de Becharaji, de Gujarat

Parámetros	Método de prueba	Resultados
pH		8.07 ± 0.1
Conductividad (mho/cm ³)		14.5 ± 1.5
Otros inorgánicos (mg/l)		
Calcio	APHA 3500 (B)	73 ± 1.3
Potasio	APHA 3500 (B)	59 ± 1.2
Magnesio	APHA 3500 (B)	29 ± 1.1
Sodio	APHA 3500 (B)	122 ± 1.2
Cloruro	APHA 4500	428.88 ± 2.2
Nitrato	IS 3025	146 ± 1.9
Fluoruro	APHA 4500 (D)	1.9 ± 0.1
Sulfato	APHA 4500 (E)	143 ± 1.4
Metales pesados (mg/l)		
Arsénico	APHA3500 (B)	No detectado
Cadmio	APHA3500 (B)	No detectado
Cromo	APHA3500 (B)	No detectado
Cobre	APHA3111 (B)	No detectado
Plomo	APHA3111 (B)	No detectado
Mercurio	APHA3111 (B)	No detectado
Plata	APHA3111 (B)	0.01 ± 0.004
Hierro	APHA3500 (B)	0.05 ± 0.006

Enriquecimiento del cultivo: durante el proceso de enriquecimiento, se monitorizó el crecimiento midiendo la densidad óptica, la reducción de la viscosidad y la producción de metabolitos secundarios (gases del espacio de cabeza, ácidos grasos volátiles y disolventes). La figura 4a y la figura 4b muestran la producción de gases del espacio de cabeza y de los ácidos grasos volátiles a temperaturas diferentes. Como se observa, la producción de gases del espacio de cabeza y ácidos grasos volátiles alcanza su máximo a los 70°C.

Se observó producción de hidrógeno de los metabolitos, CO₂ y VFA para todos los grupos, al llegar al día 30. B-136 y B-90 demostraron la máxima producción de H₂, del 60 % y del 65 % respectivamente (tabla 3). Lo interesante es que solo estos dos consorcios mostraron producción de CO₂ (tabla 3). Mientras tanto, se detectaron VFA, específicamente acético ácido y ácido butírico, en los cinco consorcios de 1837-2300 mg L⁻¹ y 700-780 mg L⁻¹, respectivamente (tabla 3). También se determinó la reducción de la viscosidad del petróleo crudo entre estos cinco consorcios. Se halló que variaban de 665 a 10 cp, observándose que el MTCC 5983 denotaba la mayor reducción de todas (tabla 3). Como se observa en la figura 3, el MTCC 5983 demostró la máxima reducción de viscosidad, de 665 a 10 Cp, a 70 °C, una reducción total del 98 % al llegar al día 30. La tensión interfacial mostró una reducción en el rango de 30-58 % con MTCC 5983 (de 49 mN/m a 14 mN/m; 30 % de reducción) a 22-25°C. Sobre la base de estos valores, se consideró que el B-90 era el más eficiente, por lo que se seleccionó para otros estudios.

Tabla 3. Análisis del petróleo y de los metabolitos producidos por consorcios microbianos aislados de Becharaji

<u>Parámetros</u>	<u>MTCC5983</u>
Morfología	Varillas gram-positivas
Viscosidad (cP) a 70°C (tratado/control)	10/665 cP
Tolerancia de temperatura	60-80°C
Tolerancia de la salinidad	0-2 % de NaCl
Producción de gas	
Producción de H ₂ (%)	58-65
Producción de CO ₂ (%)	22-27
Producción de VFA	

Acético ácido (mg/l)	1837-2300
Ácido butírico (mg/l)	700-780
Disolventes (mg/L)	
Etanol	128
Propanol	82
Butanol	11

Métodos analíticos: el MTCC 5983 es capaz de degradar diversos componentes del petróleo pesado. Transformó con eficacia los aromáticos, a saber, el naftaleno, el fluoranteno, el pireno, el benzo[a]antraceno, el criseno, el benzo[b]fluoranteno, el benzo[k]fluoranteno y el dibenzo[b]antraceno, en alcanos. La mayor biodegradación de todas se observó en el benzo[k]fluoranteno (96.5 %), en el benzo[a]antraceno (94.9 %), en el benzo[b]fluoranteno (92 %), seguidos por el dibenzo[b]antraceno (77 %), el pireno (73.7 %) y finalmente, el criseno (51 %) (tabla 4). Esta clasificación se correlacionó con la solubilidad del agua de los hidrocarburos poliaromáticos, es decir, cuanto más hidrosoluble el compuesto, mayor es su desaparición del petróleo. También, en el caso del naftaleno, se observó un 63 % de degradación. Se notó que durante el proceso microbiano, algunos de los anillos de naftaleno (cadenas laterales de alquilo) se rompieron de las moléculas de hidrocarburo poliaromáticos con cadenas largas, de enlaces C-C. Se sabe que estos enlaces C-C vuelven a adoptar la forma de alcanos rectos, que podrían ser el posible motivo de la mayor concentración de alcanos observados en el estudio. Los cromatógrafos GC-FID del petróleo pesado antes y después del tratamiento microbiano muestran un aumento significativo en la concentración de los alcanos, que varía de C₁₄-C₃₆ como se observa en las figuras 5a y b. La biodegradación de los petróleos pesados conduce al enriquecimiento con

hidrocarburos más ligeros y una redistribución general de los hidrocarburos, tal como se observa en el estudio. Además, algunos de los hidrocarburos (C_{19} , C_{27} , C_{34} , C_{36}) estuvieron ausentes en el petróleo crudo inicialmente, aunque después de la biodegradación, estos compuestos se observaron de un modo prominente. Parece que el MTCC 5983 y sus metabolitos posibilitan las interacciones del petróleo crudo. Esta reacción se produjo rápidamente durante 10 días al principio y continuó con éxito durante 30 días, después de lo cual no hubo cambios en la viscosidad. Dicha extensión sostenida de interacción es beneficiosa, dado que podría conducir a que los componentes pesados se degraden aún más. Las reacciones microbianas se producen principalmente en los enlaces débiles del petróleo pesado, tales como los enlaces C-O, C-S y C-N. El número de estos enlaces débiles es menor en el petróleo pesado, de modo que probablemente a los 30 días, todos estos enlaces débiles se dividen y la reacción finaliza. Durante este proceso, también pueden tener lugar muchas otras reacciones, tales como pirólisis, hidrogenación, apertura de anillos, cierre de anillos y desulfuración referida a los enlaces C=S, C=O, C=N y C=S, lo cual deviene en el incremento de la relación H/C ratio de las fracciones superiores y por lo tanto, mejoran la calidad del petróleo pesado.

Los análisis de composición del petróleo pesado antes y después del tratamiento con B#90 se estudiaron por FT-IR. El petróleo pesado se caracterizó por FT-IR en la región próxima (número de onda $4000-400\text{ cm}^{-1}$). Los picos que representan la región del grupo hidroxilo ($3100-3600\text{ cm}^{-1}$), la región de extensión de los aromáticos ($3000-3100\text{ cm}^{-1}$), la región de extensión de los alifáticos ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$), la región del grupo carboxilo/carbonilo (pico en 1710 cm^{-1}), el carbono aromático (pico en 1604 cm^{-1}) y el aromático fuera de la

región del plano ($900-700\text{ cm}^{-1}$) se midieron y también se calcularon diversas otras relaciones de grupos funcionales. Se observó que incluso después del tratamiento microbiano, las bandas particulares en 3447 , 2925 , 2852 , 2362 , 2332 , 1699 , 1635 , 1557 , 1506 , 1461 , 1416 , 1376 , 1300 , 721 cm^{-1} fueron casi iguales que el control sin tratar (figuras 5a, 5b). Las representaciones de estas bandas se explican en la tabla 5. La presencia de alcano se indicó por el fuerte pico de absorbancia de la vibración C-H en 2925 (metoxilo) y aproximadamente 2852 cm^{-1} , y las vibraciones de deformación C-H en 1461 cm^{-1} . El pico ancho de absorbancia de la vibración de la extensión O-H entre $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ demuestra la presencia de impurezas del agua y otro O-H polimérico en el petróleo pesado. Tras el tratamiento con B#90, las bandas en 3390 cm^{-1} y 3447 cm^{-1} , asignadas a los picos de extensión OH se tornaron marcadamente apreciables, lo que indica que se redujo el anillo de aromáticos en las muestras tratadas (B#90). El pico de absorbancia en 1699 y 1635 cm^{-1} representó la vibración de extensión de C=O, indicando la presencia de cetonas y aldehídos. La presencia de vibraciones de extensión tanto de O-H como de C=O también ilustra la presencia de ácidos carboxílicos y sus ésteres derivados. Notablemente, las bandas en 2659 , 779 , 614 , 540 y 518 cm^{-1} desaparecieron, en tanto que en $1300-950\text{ cm}^{-1}$ aparecieron después del tratamiento. Los picos de absorbancia entre $900-650\text{ cm}^{-1}$ y la extensión tanto de C=O como de C-O demuestra la presencia de ésteres aromáticos. La aparición de picos entre 1300 y 950 cm^{-1} también se debió a la presencia de alcoholes primarios, secundarios y terciarios, fenoles, éteres y ésteres que muestran la extensión de C-O y la vibración por deformación de O-H. Todos estos cambios indican que algún heteroátomo, principalmente situado en las estructuras aromáticas

condensadas, podría eliminarse después del tratamiento microbiano y por lo tanto, reducir la cantidad total de anillos. Los hidrocarburos saturados, obviamente ganaron intensidad después de la reacción microbiana. Esto también ilustra que el contenido saturado se redujo como resultado de la hidrogenación del contenido insaturado y de la pirolisis de los alcanos de cadena larga/hidrocarburos poliaromáticos.

Tabla 4. Degradación microbiana de los hidrocarburos del petróleo

N.º de muestr a	Hidrocarburos de petróleo identificados	Concentración (mg/ml)	
		Control (Petróleo no tratado)	Tratado con <u>MTCC5983</u>
1.	Hidrocarburo (C13)	0.0	0.0
2.	Hidrocarburo (C14)	0.0319	0.0654
3.	Hidrocarburo (C15)	0.0	0.0
4.	Hidrocarburo (C16)	0.2719	1.4126
5.	Hidrocarburo (C17)	0.2229	2.1786
6.	Hidrocarburo (C18)	0.2593	2.1004
7.	Hidrocarburo (C19)	0.0	2.5356
8.	Hidrocarburo (C20)	0.2926	2.7839
9.	Hidrocarburo (C21)	0.2710	3.3954
10.	Hidrocarburo (C22)	0.1138	1.4845
11.	Hidrocarburo (C23)	0.1593	1.7992
12.	Hidrocarburo (C24)	0.1423	1.1046
13.	Hidrocarburo (C25)	0.1956	1.8280
14.	Hidrocarburo (C26)	0.2266	1.3681
15.	Hidrocarburo (C27)	0.0	1.2826
16.	Hidrocarburo (C28)	2.5880	2.4790
17.	Hidrocarburo (C30)	0.3043	0.7937
18.	Hidrocarburo (C32)	0.2100	0.2596

N.º de muestr a	Hidrocarburos de petróleo identificados	Concentración (mg/ml)	
		Control (Petróleo no tratado)	Tratado con <u>MTCC5983</u>
19.	Hidrocarburo (C34)	0.0	2.1473
20.	Hidrocarburo (C36)	0.0	0.2734
21.	Naftaleno	0.000626	0.00023
22.	Acenaftileno	0.0	0.0
23.	Antraceno	0.00102	0.00529
24.	Fluoranteno	0.00047	0.00031
25.	Pireno	0.001143	0.0003
26.	Benzo[a]antraceno	0.000591	0.00003
27.	Criseno	0.003947	0.00192
28.	Benzo[b]fluoranteno	0.000384	0.00003
29.	Benzo[k]fluoranteno	0.005542	0.00019
30.	Dibenzo[a,h]antraceno	0.003368	0.00077

Tabla 5. Asignación de bandas infrarrojas observadas tras la reducción de la viscosidad del petróleo con #B90

Bandas infrarrojas (en el número de onda cm-1)		Grupo	Clase de compuesto
Control	Tratada con <u>MTCC5983</u>		
3390	3447	Extensión de OH	O-H polimérico Impurezas del agua
2923	2925	Extensión de C-H	Alcano
2848	2852		

Bandas infrarrojas (en el número de onda cm ⁻¹)		Grupo	Clase de compuesto
Control	Tratada con <u>MTCC5983</u>		
2659 2360 2343	2362 2332	Extensión de C-H	Alcano
1697	1699	Extensión de C=O	Cetonas, aldehídos, ácidos carboxílic os
1633 1559	1635 1557	Extensión de C=C Extensión de C=C	Alcano Alcano
1457 1416 1375 1340 1300	1461 1416 1376 1300	Flexión de C-H Extensión de C-O Extensión de C-O Flexión de O-H Flexión de O-H	Alcano Alcoholes Alcoholes Fenol, ésteres, éteres
-	1256	Enlace para el sulfato	
-	1083	Vibración de la extensión de Si-O	
779	-	Flexión de O-H	Compuestos aromáticos
730 614 540 518	721 - - -	Ausente	

Rendimiento del MTCC 5983 bajo estrés abiótico: la temperatura influye en la biodegradación del petróleo por su efecto sobre la naturaleza física y la composición química del petróleo, la tasa de metabolismo de los hidrocarburos por los microorganismos y la composición de la comunidad microbiana. La reducción de la viscosidad se monitorizó para un rango termofílico de temperatura (60-80 °C). Según resulta evidente a partir de la figura 3, se halló que se observaba un mayor porcentaje de reducción (75-98 %) a los 60-70 °C, en comparación con los 80 °C, donde se reducía sensiblemente (14 %). Se reconoce que las enzimas de los termófilos son más resistentes a la desnaturalización física y química, mientras que otra ventaja de usar los termófilos en los procesos de biorremediación consiste en los índices más altos de crecimiento (Meintanis y colaboradores, 2006). El consorcio MTCC 5983 demostró la máxima reducción de viscosidad a un pH de 7, lo cual pudo deberse al rango óptimo para la degradación de los hidrocarburos. También se estudió el efecto de la salinidad sobre la reducción de viscosidad. La salinidad desempeña una función importante sobre el proceso de aceleración de la reducción de la viscosidad de petróleo crudo. La figura 6a muestra la reducción de la viscosidad a una concentración diferente de NaCl. El MTCC 5983 pudo crecer hasta a una concentración de NaCl del 2 % pero demostró que lograba la máxima reducción de la viscosidad si no se añadía NaCl. No obstante ello, incluso al 2 % el consorcio pudo reducir con eficiencia la viscosidad hasta el 80 %. Las figuras 6b y 6c muestran la producción de gases del espacio de cabeza y ácidos grasos volátiles a una concentración diferente de NaCl, respectivamente. Se observó la máxima producción de gases del espacio de cabeza y ácidos grasos volátiles cuando no se añadió NaCl. Sin embargo, incluso con

el 2 % de NaCl, el consorcio logró producir gases del espacio de cabeza y ácidos grasos volátiles con eficiencia.

Prueba de inundación del núcleo del MTCC 5983: tal como se evaluó después de 10 días, la recuperación del petróleo mejoró en un 10.4 % de HCPV y 24.8 % de Sor. Después de la acción microbiana, hubo una reducción de viscosidad del 86.0 %: de 965 cp bajó a 135 cp. Las condiciones y los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones y resultados de la prueba de inundación del núcleo

Cultivo microbiano	MTCC 5983
Tipo de petróleo	Petróleo pesado de Bechraji
Gravedad API, grados	12.82
Viscosidad a 70° C., cp	965 a un esfuerzo cortante de 100
Salinidad del agua de la formación, mg/l	9126.62
Tipo de formación	Arenisca
Temperatura, °C.	70
Volumen del poro, ml	52
Porosidad, %	41.2
Flujo, ml/h	5-20
Saturación inicial del petróleo, %	74.2
Saturación del agua irreducible, %	25.8
Recuperación inundación con agua, %	29.0
Recuperación adicional con el microbio MTCC 5983, MEOR), %	10.4
Recuperación total (inundación con agua y MEOR), %	39.4

Viscosidad posterior a la acción microbiana, cp	135
Metabolitos detectados	Ácidos, gas, disolventes, biomasa

En líneas generales, la invención provee un proceso para reducir la viscosidad del petróleo pesado en un pozo petrolero, empleando un consorcio de microbios que comprende un microbio que tiene el número de entrada MTCC 5983. El MTCC 5983 del consorcio podría reducir la viscosidad del petróleo pesado hasta en el 98 %, a 70°C, con una capacidad de degradación específica del 56 % para el asfalteno. Ya se ha estudiado e informado que la degradación anaeróbica intensiva con respecto a los componentes aromáticos individuales como el acenafteno, pireno, fluoranteno, antraceno por las cepas aisladas de los desechos del petróleo está en el rango de 70-100 %, aunque la degradación selectiva del asfalteno en el petróleo crudo como una entidad completa no se ha reportado hasta el momento. La presente descripción es la primera de su clase en informar tales resultados. El B#90 puede crecer solamente y utilizar el petróleo crudo, asegurando además su rentabilidad. Puede producir H₂, CO₂ y VFA (65 %, 27 % y 2500 mg L⁻¹, respectivamente) lo cual es una contribución adicional al represurizar los reservorios y formar emulsiones. Incluso a una concentración de NaCl del 2 %, se ha hallado que reduce la viscosidad hasta en un 80 %. Las capacidades metabólicas de este consorcio de sobrevivir y crecer en condiciones seleccionadas de los reservorios de petróleo pesado, tales como alta temperatura, salinidad y presencia de petróleo prometen una función como candidato para reducir la viscosidad. La aplicabilidad de este consorcio y sus productos derivados se están probando en las condiciones del

reservorio. Promete una tecnología de fermentación a gran escala y rentable, que puede mejorar la economía general y accesibilidad del petróleo pesado.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

