

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPRODUCTOS DE INTERÉS PARA MEOR

EVALUATION OF THE FORMATION OF BIOPRODUCTS OF INTEREST TO MEOR

Mary Elizabeth Sánchez Labrada^{a,*} (0009-0005-1817-8143)

Thais Hernández Gómez^a (0000-0002-7767-6282)

Francisca González Hernández^a (0000-0002-0878-4546)

Silvia Acosta Díaz^a (0000-0001-9462-8541)

María Esther Montalván García^a (0000-0002-0140-2760)

Aysbel Trujillo Crespo^a (0009-0008-2262-3985)

^a Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churruca No.481 e/Via Blanca y Washington, Cerro, código postal 10600. La Habana Cuba.

^{a,*} m.labrada@ceinpet.cupet.cu

Recibido: 07 de julio de 2024;

Aceptado: 10 de marzo de 2025;

RESUMEN

Entre los problemas de mayor incidencia que afectan a la industria petrolera se señala la baja eficiencia de extracción de hidrocarburos de sus reservorios naturales. Ante tal situación, el uso de la biotecnología, como herramienta en la recuperación mejorada de petróleo, se convirtió en una alternativa atractiva y económicamente factible. En tal sentido, a nivel mundial se renovó el interés por las metodologías que incluyen el empleo de microorganismos MEOR (según sus siglas en inglés de *Microbial Enhanced Oil Recovery*) es un término general que se refiere al uso de microorganismos tales como bacterias y/o *archae* y sus productos metabólicos (ácidos, gases, biopolímeros, biotensoactivos y otros). Los procesos microbiológicos de MEOR se consideran ventajosos respecto a las variantes físico-químicas porque son más económicos, consumen menos energía, no dependen de los precios del petróleo y no emplean sustancias agresivas al medio ambiente por ser estas biodegradables. El objetivo de la investigación consistió en evaluar las potencialidades de microorganismos autóctonos de pozos de perforación para su empleo en procesos de MEOR. Se aislaron microorganismos del sector Franja Norte Petrolera Cubana, donde se valoraron características de interés como producción de ácidos y gases, determinación cualitativa de la formación de biopelículas (presencia de exopolisacáridos) a través de la adherencia al rojo Congo, así como la producción de bio-tensoactivos mediante tres métodos diferentes: el colapso de la gota, la tensión interfacial y la dispersión del petróleo. De los ensayos realizados a las cepas, la No. Cepa: 241-2, resultó ser la más satisfactoria para continuar con los ensayos de los procesos de MEOR. Para futuras investigaciones fueron descartadas las No. Cepas: 237-1 y 237-2, al no cumplir con ninguno de los requisitos en los ensayos realizados.

Palabras claves: microorganismos, ácidos y gases, biopelículas, biotensoactivo.

ABSTRACT

Among the most prevalent problems affecting the oil industry is the low efficiency of hydrocarbon extraction from natural reservoirs. Given this situation, the use of biotechnology as a tool for enhanced oil recovery has become an attractive and economically feasible alternative. In this regard, there has been renewed interest worldwide in methodologies that include the use of microorganisms. MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) is a general term that refers to the use of microorganisms such as bacteria and/or *archae* and their metabolic products (acids, gases, biopolymers, biosurfactants and others). MEOR microbiological processes are considered advantageous over physical-chemical variants because they are cheaper, consume less energy, do not depend on oil prices and do not use substances that are aggressive to the environment because they are biodegradable. The objective of the research was to evaluate the potential of native microorganisms from drilling wells for use in MEOR processes. Microorganisms were isolated from the Cuban Northern Oil Belt sector, where characteristics of interest were assessed, such as acid and gas production, qualitative determination of biofilm formation (presence of exopolysaccharides) through adherence to Congo red, as well as the production of bio-surfactants through three different methods: drop collapse, interfacial tension and oil dispersion. From the tests carried out on the strains, Strain No. 241-2 was found to be the most satisfactory for continuing with the MEOR process tests. Strains No. 237-1 and 237-2 were discarded for future research, as they did not meet any of the requirements in the tests carried out.

Keywords: microorganisms, acids and gases, biofilms, biosurfactant.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza de los reservorios carbonatados fracturados y las características físico-químicas de los crudos pesados implican un bajo factor de recuperación. Después de una recuperación por métodos convencionales, aún queda atrapado en los poros de la roca generalmente más del 60 % del total de crudo (Yernazarova *et al.*, 2016). 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 la biotecnología, como herramienta en la recuperación mejorada de petróleo, se convirtió en una alternativa atractiva y económicamente factible (Batista *et al.*, 2011). En tal sentido, a nivel mundial se renovó el interés por las metodologías que incluyen el empleo de microorganismos para que se aumenten los índices de recuperación de petróleo (MEOR, según sus siglas en inglés de *Microbial Enhanced Oil Recovery*).

Las bacterias y en general todos los microorganismos son vistos como criaturas simples, sin embargo, el estudio intensivo de las bacterias ha revelado que poseen una gran capacidad de diferenciación y comportamientos sumamente complejos, siendo la formación de comunidades embebidas dentro de una matriz, conocida como biopelícula, un claro ejemplo de organización compleja para la comunicación y la supervivencia de comunidades bacterianas. Las biopelículas pueden ser definidas simplemente como comunidades de bacterias que se encuentran unidas a una superficie encerradas en una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (SPE). La formación de biopelículas representa un estadio de crecimiento que permite a las bacterias sobrevivir en condiciones hostiles y dispersarse después como células individuales para colonizar nuevos nichos una vez que las condiciones se vuelvan favorables (Gudynaite *et al.*, 2022). Si se parte del hecho de que los yacimientos de petróleo son ambientes extremos y hostiles para la proliferación de la vida microbiana, es de esperar que la colonización de los pozos petroleros se realice bajo este tipo de crecimiento.

En distintas ramas de la industria se analizó los efectos perjudiciales o favorables de las biopelículas, pero en la industria petrolera estas son poco estudiadas, cuando se aplican a los procesos de MEOR. A causa de la escasez de estudios que se vinculan a la formación de biopelículas y los procesos de recuperación de petróleo, resulta de interés la determinación la formación de este tipo de organización biológica.

Los microorganismos producen una variedad de metabolitos durante su ciclo de vida que pueden ser útiles para la recuperación de petróleo. Dichos metabolitos bioactivos pueden disminuir la tensión entre las fases agua-crudo o crudo-roca y aumentar la solubilidad por la acción de los biotensoactivos, producir un taponamiento selectivo por el crecimiento del propio microorganismo o por sus bioproductos, y disminuir la viscosidad del crudo. Además, los microorganismos pueden degradar largas cadenas hidrocarbonadas y producir ácidos los cuales disuelven minerales en la roca, aumentando su permeabilidad (Zhan y cols., 2017). Los bioproductos se generan en el yacimiento y se encargan de mejorar la movilidad del crudo; eliminar los depósitos de asfaltenos; parafinas, escamas y la corrosión en las tuberías de producción. Todo lo expresado repercute en las tasas de extracción y aumenta el factor de recobro. Entre los bioproductos útiles para los procesos de MEOR se encuentran (Omoniyi y Abdulmalik, 2015): ácidos (butírico, fórmico, acético, láctico y propiónico), gases (metano, dióxido de carbono e hidrógeno) y biotensoactivos (BTA) (treololípidos, ramnolípidos y lipopolisacáridos).

En Cuba se cuenta con experiencias previas de tratamientos biológicos en yacimientos de petróleo. Uno de los primeros trabajos vinculados a este tema se realizó en el CEINPET en 1992 en el Yacimiento Boca de Jaruco (capa B), donde se realizó una fermentación in situ a partir de cepas endógenas, estos resultados fueron alentadores y reconocidos como relevantes por la academia de Ciencias de Cuba en la temática “Incremento de la Producción de Petróleo aplicando Métodos Biotecnológicos”. En paralelo el Instituto de Oceanología realizó trabajos relacionados utilizando un consorcio de 5 bacterias marinas productoras de biotensoactivos, se inyectaron en 19 pozos del yacimiento Boca de Jaruco abarcando distintas capas productoras (capas A1A2, B, C, D, E, S y S2S3). Aunque la primera inyección en este campo se realizó en marzo de 1992, se estudiaron los datos productivos desde 1991 hasta 1994. Los resultados indicaron que, del total de pozos estimulados, solamente en cinco de ellos se observó un efecto positivo luego de la inyección del biotensoactivo.

Posteriormente surgió en el CEINPET un proyecto para continuar con la aplicación de estas tecnologías MEOR “Aplicación de la Biotecnología en el incremento de la producción de petróleo”, con el código 1110 (Bugnes y cols., 1999). Como parte de este proyecto se realizaron un gran número de etapas de investigación (más de 20), entre las que se cuentan: selección de sitios para aplicación de tratamientos microbiológicos, control de los efectos de la inyección en los distintos polígonos y estudios de simulación del comportamiento de

microorganismos en medio poroso. Los informes de etapas de este proyecto se encuentran archivados en la Biblioteca del CEINPET.

En Cuba existe la necesidad de que se obtengan tecnologías propias y económicas, que faciliten los procesos de extracción de crudo. MEOR se presenta como una variante de interés para la mejora del factor de recuperación de los yacimientos cubanos. De ahí que surge la necesidad de que se investiguen las tecnologías, en correspondencia con los recientes adelantos científico-técnicos que se reportan en la bibliografía. Así, se contará con una tecnología propia, adaptada a las condiciones de la industria petrolera cubana, con la que se alcance el incremento y la eficiencia de la extracción de petróleo. El objetivo de la investigación consistió en evaluar las potencialidades de los microorganismos autóctonos de pozos de perforación para su empleo en procesos de MEOR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aislaron microorganismos del sector Franja Norte Petrolera Cubana, donde se analizaron características de interés como producción de ácidos y gases, determinación cualitativa de la formación de biopelículas (presencia de exopolisacáridos) a través de la adherencia al rojo Congo y la producción de biotensoactivos mediante tres métodos diferentes: el colapso de la gota, la tensión interfacial y la dispersión del petróleo.

Microorganismos empleados

De 20 aislados bacterianos procedentes de una muestra de crudo del sector Franja Norte Petrolera Cubana, se realizó una preselección de 13 de ellas: 236, 238, 239, 243-1, 234, 245-3, 241-1, 241-2, 237-1, 244-1, 240, 237-2, 243-3, tomando como criterio, las que manifestaron resistencia a elevadas temperaturas entre los rangos de 37 y 48 °C, y las elevadas concentraciones de sales.

Las cepas seleccionadas se encontraban refrigeradas a modo de conservación, por lo que inicialmente se les comprobó su pureza a través del método de la tinción de Gram.

Determinación cualitativa de la formación de biopelículas (presencia de exopolisacáridos) a través de la adherencia al Rojo Congo

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 (Gorbushina, 2007). Esta es una organización en forma de complejos entramados, en la que las células que la integran se comunican entre sí a través de señales químicas (quorum sensing). Además, manifiestan la capacidad de censar las condiciones ambientales externas, de modo que responden en conjunto para el beneficio de la comunidad (Madigan y cols., 2014).

Un estudio del año 2006 sugiere que la adhesión a la pared del poro es un proceso que depende en primera instancia de las propiedades del medio, la superficie de la roca y la superficie celular (Kim, 2006). Otras investigaciones indican que los microorganismos realizan los procesos activos de adhesión/separación como respuesta a la disponibilidad de nutrientes y, como se ha señalado anteriormente, como un mecanismo de supervivencia (Ginn, 2002; Rockhold y cols., 2004).

Los microorganismos penetran en el reservorio, a la vez que consumen sustratos y crecen produciendo importantes metabolitos. Una combinación de los diferentes mecanismos, que depende de los microorganismos empleados y los bioproductos que estos generan, moviliza el petróleo residual o mejora el área de barrido. A causa de la escasez de estudios que se vinculan a la formación de biopelícula y los procesos de recuperación de petróleo, resultaba de interés la determinación la formación de este tipo de organización biológica como parte de la colonización de la superficie rocosa de núcleos pertenecientes a la zona de reservorio de distintos yacimientos.

Los mecanismos de MEOR más importantes en los que se ha descrito la influencia de las biopelículas, son los siguientes (Nielsen, 2010):

- ✓ Desvío de fluidos debido al crecimiento microbiano y a la producción de biopolímeros (taponamiento selectivo).

- ✓ Reducción de la tensión interfacial y alteración de la mojabilidad debido a la producción in situ de biotensoactivos.

La capacidad de formación de biopelícula se evaluó de manera cualitativa analizando la habilidad de producir exopolisacáridos por los microorganismos en estudio. El ensayo se realizó incorporando algunas modificaciones a la propuesta descrita por Freeman *et al.* (1989). A partir del crecimiento de las cepas bacterianas en medio compuesto por agar base sangre (20 g/l), glucosa (10 g/l) y el colorante rojo Congo (0,4 g/l) se incuban durante 24 horas a 37 °C. Se identificaron como productoras de exopolisacáridos aquellas que su morfología colonial mostro una textura rugosa y coloración negra, mientras que en las no productoras del exopolisacáridos las colonias típicas se presentaban rojas y lisas.

Producción de ácido y gas

Producción de ácidos

El crecimiento de algunas bacterias con determinados nutrientes genera la producción de ácidos tales como: láctico, acético, fórmico y butírico. Los señalados ácidos posibilitan ser útiles en reservorios carbonatados, debido a que causan disolución de las rocas carbonatadas, aumentando su porosidad y permeabilidad. Tal incremento facilita el movimiento del petróleo (Higuera, 2012). La producción in situ de dichos ácidos posibilita su utilización en la liberación de crudo atrapado en las rocas dada la baja permeabilidad de las mismas y la limpieza de la vecindad del pozo

Producción de gases

La producción microbiana de gases como dióxido de carbono (CO₂), hidrógeno (H₂) y metano (CH₄) ese adjudica al metabolismo fermentativo de bacterias y arqueas. Los citados gases pueden usarse en la recuperación mejorada a causa de que generan un aumento en la presión de fondo, especialmente en los yacimientos con muy baja presión (Higuera, 2012). La generación de dióxido de carbono y otros gases disminuyen la viscosidad del petróleo por solubilización en el mismo (Arenas, 2012).

A partir de un cultivo en medio AN en conservación, se tomó una muestra de biomasa para realizar un inóculo disolviéndolo en tubos que contenían caldo Nutriente (CN). Se preparó un inóculo estandarizado, de cada aislado, al tubo 0,5 de la escala de McFarland, los que se incubaron a 37 °C durante 24 h a 150 r.min⁻¹. A partir de este cultivo (inóculo) se inocularon 10 µL en tubos que contenían 10ml del medio requerido para este ensayo (agua peptona (7,5 g), glucosa (10 g), indicador rojo fenol (0,4 g) para 500 ml de agua destilada), que, además, contenían campanas de Durham para la observación de producción de gas. Los ensayos se realizaron de forma duplicada. La producción de ácido por los microorganismos se determinó al observarse un viraje del indicador de rojo a amarillo, de mantenerse el color rojo en el medio de cultivo se interpretó un resultado negativo y por tanto la presencia de cepas no productoras de ácido. La presencia de burbujas en la campana Durham indica que existe producción de gas.

Determinación de la producción de biotensoactivos (BTA)

Los microorganismos productores de biotensoactivos son fundamentales para que se incremente la producción de petróleo a través de los procesos de MEOR. El aislamiento e identificación de las bacterias productoras de este metabolito, a partir de sus ecosistemas naturales, representa una ventaja ya que son microorganismos adaptados a las condiciones extremas presentes en estos ambientes (Dong *et al.*, 2016). Por esta razón se evaluó la habilidad de producción de biotensoactivos por las cepas estudiadas mediante tres métodos diferentes: el colapso de la gota, la tensión interfacial y la dispersión del petróleo.

Ensayo del colapso de la gota

El método llamado colapso de gota es un método rápido que se utiliza para detectar biotensoactivos en presencia de medios de cultivo. En esta prueba se toma una gota de suspensión celular y se traslada a una superficie cubierta de aceite. Si las gotas contienen biotensoactivos, éstas colapsan, de no ser así, permanecen estables (Martínez Aguilar, 2014). El colapso de la gota se determinó adicionando 10 µL del sobrenadante libre de células de cada uno de los aislados bacterianos (cultivados previamente en medio mínimo MBH más glicerol e incubadas a 30°C y 150 r.min⁻¹ por 24 h) en un portaobjeto conteniendo una capa de crudo. Se utilizó como control las mismas condiciones, pero adicionando 10 µL de agua destilada estéril (Varadavenkatesan y Murty, 2013).

Composición del Medio MBH (g/l): KH_2PO_4 (1.0); Na_2HPO_4 (1.0); NH_4NO_3 (0.5); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5); $\text{MgSO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (0.2); $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.02); FeCl_3 (0.002); $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.002).

Ensayo de la dispersión del petróleo

A una placa Petri (90 mm de diámetro) se añadió 30 ml de agua destilada), posteriormente se adicionó 1 ml de crudo y 10 μL del sobrenadante libre de células de cada cultivo (previamente incubadas a 30°C y 150 r.min^{-1} por 24 h) en el centro de la capa formada por el crudo y usando una pipeta. La aparición de zonas claras fue indicativo de la presencia de biotensoactivos (Maneerat y Phetrong, 2007). Se empleó como control 10 μL de medio de cultivo sin inocular.

Tensión interfacial

La tensión interfacial (TI) entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro. De dicha manera, la tensión interfacial entre dos líquidos se relaciona con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. Para disminuir la TI, los tensoactivos actúan como un “puente” formando una tercera fase de “microemulsión” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo (Raiger y López, 2009).

Los biotensoactivos son compuestos intracelulares o extracelulares, sintetizados por los microorganismos durante su crecimiento en sustratos específicos, durante la fase estacionaria o en respuesta a las condiciones ambientales. Al ser producto del metabolismo secundario, no se sintetizan en las primeras fases del crecimiento microbiano (Madigan *et al.*, 2014).

A partir de un inóculo estandarizado, de cada aislado, a escala de McFarland, se inocularon en tubos con medio MBH suplementados con glicerol, los que se incubaron a 37°C durante 24 h a 150 r.min^{-1} . Para la determinación de la producción de BTA se tomó una muestra de 50 ml de precultivo en medio MBH y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos (centrífuga modelo español Digicen 21, Orto Alresa), el pellet (restos celulares) fue descartado. El sobrenadante libre de células fue utilizado para la determinación de la tensión interfacial entre la fase acuosa y la oleosa. Se determinó mediante el método del Anillo de Du Noüy (Tensiómetro Krüss K100, Alemania), utilizando el software KrüssAdvance (Fig. 1).



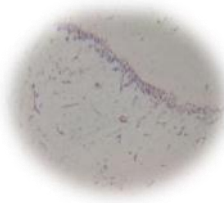
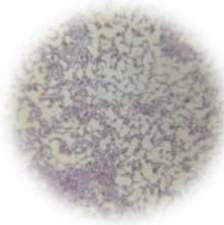
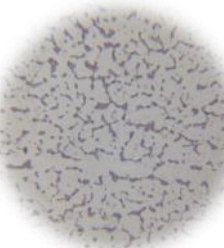
Fig. 1. Tensiómetro de Fuerza Krüss K100

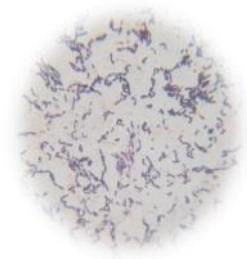
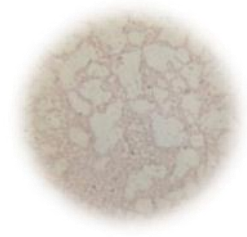
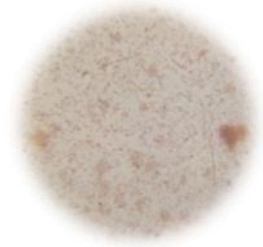
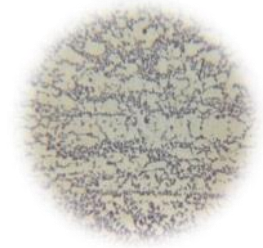
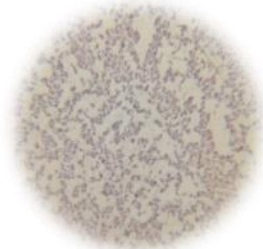
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

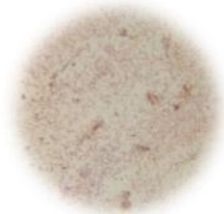
Verificación de la pureza de las cepas

El proceso de tinción de Gram se realizó como una forma de comprobar la pureza de las cepas a trabajar. Los resultados obtenidos corroboran estudios anteriores, demostrándose la pureza de los aislados para continuar el trabajo con los mismos (Tabla 1).

Tabla 1. Características tintoriales de los aislados bacterianos

No. muestra	Descripción tintorial	Foto
236	Gram +, bacilos grandes, espora lateral	
238	Gram +, bacilos medianos	
243-1	Gram +, bacilos medianos	
234	Gram+, bacilos medianos, finos	

No. muestra	Descripción tintorial	Foto
245-3	Gram+, bacilos largos	
241-1	Gram-, cobacilos	
241-2	Gram-, cocobacilos	
237-1	Gram-, bacilos pequeños	
244-1	Gram+, bacilos pequeños	
240	Gram+, bacilos pequeños	

No. muestra	Descripción tintorial	Foto
239	Gram+, bacilos grandes, esporas lateral y central	
237-2	Gram-, bacilos pequeños	
243-3	Gram+, bacilos pequeños	

Determinación cualitativa de la formación de biopelículas (presencia de exopolisacáridos) a través de la adherencia al rojo Congo

Entre las cepas estudiadas se evidenció, en algunos casos, la capacidad de producir la matriz de exopolisacáridos que compone las biopelículas bacterianas, al observarse la aparición de colonias negras rugosas sobre las placas Petri que contenían el medio de cultivo específico. Adicionalmente, las cepas no productoras del exopolisacáridos presentaron colonias de color rojo. De las trece cepas estudiadas, ocho resultaron ser Rojo Congo negativas donde las colonias formadas fueron de color rojo (238, 243-1, 245-3, 241-2 y 243-3) mientras que el resto resultaron rojo Congo positivo al mostrar colonias negras y rugosas (Figura 2).

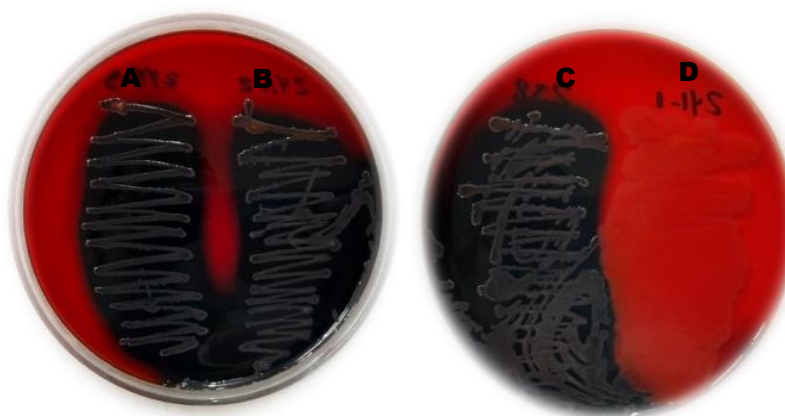


Fig. 2. Imagen rojo Congo positivo de las cepas (A) :241-2, (B):245-3, (C): 238rojo Congo negativo (D) :241-1

Resultado similar fue obtenido por Rivera *et al.* en el 2018 cuando realizó un estudio de adherencia y formación de biopelículas sobre superficies abióticas lisas en *Staphylococcus* spp. En este estudio se utilizó como fuente de carbono en el medio agar rojo Congo la glucosa (RCA-G), donde se observó que las cepas luego de 24 horas de incubación, mostraron colonias homogéneas negra/rugosas y otras coloraciones rojas/lisas que caracterizan a las cepas como productoras y no-productoras del exopolisacáridos, respectivamente. Este bioproducto sirve como matriz para la formación de biopelículas.

Los mecanismos de MEOR más importantes en los que se ha descrito la influencia de las biopelículas son los siguientes: desvío de fluidos debido al crecimiento microbiano y a la producción de biopolímeros (taponamiento selectivo); reducción de la tensión interfacial y alteración de la mojabilidad debido a la producción *in situ* de biotensoactivos y acumulación del mismo en la vecindad de las biopelículas (Nikolova & Gutierrez, 2020; Nielsen, 2010). Determinar la capacidad de generación de biopelículas por parte de los aislados resulta una característica de interés, ya que su producción desempeña un papel importante en los procesos de MEOR (López-Peña *et al.*, 2019).

Producción de ácido y gas

Para la determinación de la producción de ácido y gas se empleó una técnica bioquímica que se basa en el viraje del indicador de pH al producirse ácidos, mientras que la formación de gas se detecta por retención de éste en una campana Durham. De las trece cepas estudiadas 11 fueron positivas a la producción de gas y ácido tornándose el medio de color amarillo y burbuja en las campanas de Durham, solo las cepas 237-1 y 237-2 fueron negativas en ambos ensayos (Figura 3).

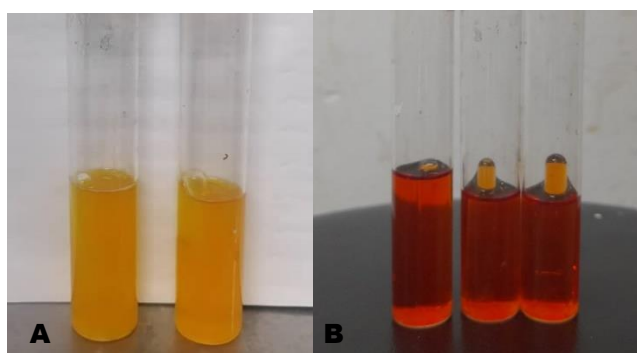


Fig. 3. Imagen (A) resultado positivo, (B) resultado negativo

La generación de ácidos por parte de los microorganismos, debido a su naturaleza corrosiva, favorece la limpieza y disolución de las rocas de carbonatos y por lo tanto contribuyen al aumento de la permeabilidad, que conduce al mejoramiento de la migración del petróleo dentro de los capilares de la roca.

En la literatura se han mencionado diversos trabajos donde se han empleado bacterias cuyos metabolitos permiten que el petróleo atrapado dentro de los capilares de la roca de formación sean biodisponibles, ya sea fracturando la estructura de los agregados por medio de ácidos o solventes, cambiando la mojabilidad de la roca, lo mismo que rompiendo la tensión interfacial entre el agua y el petróleo remanente, todo lo cual permite el flujo de petróleo crudo adicional, mejorando su recuperación (Rivera *et al* 2019).

Los microorganismos que se desarrollan en lo profundo de los reservorios de petróleo están adaptados para obtener energía de los sistemas de los que disponen, por ejemplo, el comúnmente llamado biogás por el hecho de ser producto de la actividad metabólica de las cepas microbianas. Algunos efectos de los biogases son reducción de la viscosidad, represurización del yacimiento, buen barrido del petróleo, alteración del pH del agua de formación, alteración de la tensión Interfacial, incremento de la permeabilidad por causas de la ruptura de las rocas de carbonatos, taponamiento de los poros por precipitación de minerales orgánicos tales como el carbonato de calcio y cambio en el punto de fluidez del petróleo (Rivera *et al.*, 2019). Por esta razón la producción de biogás es considerado un factor importante en el proceso de MEOR.

Determinación de la producción de biotensoactivos (BTA).

Ensayo del colapso de la gota

Del análisis de las trece cepas estudiadas, cinco de ellas mostraron colapso de la gota, las correspondientes al No. de cepa: 238, 243-1, 241-2, 244-1, 239, debido a su capacidad de superar el diámetro de gota del control negativo (agua destilada estéril). El resto de las cepas mostró un comportamiento similar al del control manteniendo la forma de la gota.

El colapso de la gota es un método cualitativo, sensible y muy eficiente, además demanda poco volumen de muestra. Su aplicación es fácil, rápida y no requiere de equipo especializado para su ejecución.

Ensayo de la dispersión del petróleo

La presencia de biotensoactivos en el sobrenadante de las cepas se analizó mediante el método del desplazamiento del petróleo. Dicha técnica es sencilla y útil para bajas concentraciones de biotensoactivos y baja actividad superficial que requiere poco volumen de muestra, lo que favorece su repetitividad (Tamura *et al.*, 2011). Si hay presencia de tensoactivos el crudo se desplaza y aparecen zonas claras. En la Figura 4 se muestran los resultados para esta prueba.

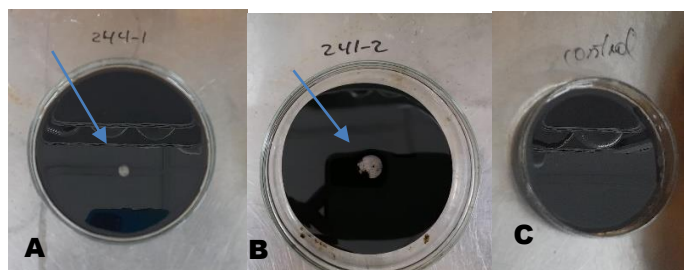


Fig.4. Desplazamiento de petróleo causado por los sobrenadantes libres de células de las cepas. (A) Cepa 244-1, (B) Cepa 241-2, (C) Control. Las líneas: azules muestran un desplazamiento parcial.

En la realización del ensayo experimental se observó la formación de un pequeño halo debido al desplazamiento del crudo cuando se aplicó el sobrenadante de los cultivos 244-1, 241-2 y 234. El resto de las cepas no mostró desplazamiento alguno de petróleo, comportándose de forma similar al control (Figura 4 C). Estos resultados confirman la producción (para las cepas con resultados positivos) y no (para la cepa con resultado negativo) de biotensoactivos.

Tensión interfacial

Seis de los aislados mostraron una TI entre los rangos de 8-17 mN/m, siendo indicativo de la presencia de BTA en el medio, mientras que el resto de las cepas evidenciaron un comportamiento similar al del control con TI entre 21-37 mN/m, por lo que no se comprobó la presencia de biotensoactivo (BTA) en el sobrenadante libre de células.

Ha sido ampliamente reportada la obtención de biotensoactivos a partir de microorganismos. Los mejores resultados en la disminución de las TS y TI se obtienen una vez optimizado el medio de cultivo, las condiciones de fermentación y la concentración de biotensoactivo necesaria (Madigan *et al.*, 2014). *B. subtilis* es conocido productor del biotensoactivo Surfactin, con el cual se puede obtener valores de TS de 27 mN/m y de TI de 1 mN/m. Otros biotensoactivos como los Rhamnolípidos de *Pseudomonas* sp. y *Corynomycolates* de *Arthobacter* sp, disminuyen la TS de 25-31 mN/m y de 33-46 mN/m; y los valores de TI entre 1-4 mN/m y 1-19 mN/m, respectivamente (Martínez, 2014; Martínez 2011).

Las potencialidades de los microorganismos autóctonos evaluados para su empleo en el proceso de MEOR se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 4. Resumen de los resultados de los ensayos

No. Cepa	Producción de BTA			Producción de ácido y gas	Formación de biopelículas
	Colapso de la gota	Dispersión del petróleo	TI (mN/m)		
236	No colapso	-	17,0	+	-
238	Colapso	-	10,3	+	+
243-1	Colapso	-	21,9	+	+
234	No colapso	+	15,6	+	-
245-3	No colapso	-	13,5	+	+
241-1	No colapso	-	21,5	+	-
241-2	Colapso	+	11,9	+	+
237-1	No colapso	-	22,6	-	-
237-2	Colapso	-	38,9	-	-
240	No colapso	-	22,09	+	-
239	Colapso	-	8,5	+	-
244-1	No colapso	+	22,8	+	-
243-3	No colapso	-	17,7	+	+

Valores de TI entre 1-4 mN/m y 1-19 mN/m, (Martínez, 2014; Martínez 2011).

De los resultados obtenidos en la investigación se señala que: la cepa (No 241-2) reflejó ser la más satisfactoria al cumplir con todos los ensayos realizados para evaluar las potencialidades en su empleo en los procesos de MEOR.

Las No. Cepas: 237-1 y 237-2 no fueron capaces de cumplir con ninguno de los ensayos realizados siendo descartadas para futuras investigaciones.

Las No. Cepa: 238 y 243-1 obtuvieron resultados favorables en los ensayos de colapso de la gota, dispersión del petróleo y producción de ácido y gas, comportándose la tensión interfacial con el valor de 10.3 mN/m para la primera y superior al límite con 21.9 mN/m para la segunda

La No. Cepa: 244-1 alcanzó resultados optimistas en los ensayos de colapso de la gota, dispersión del petróleo y ácido y gas, comportándose la tensión interfacial un poco superior a los límites evaluados y no contó con la presencia de exopolisacáridos en la formación de biopelículas.

La No. Cepa: 239 logró resultados positivos en los ensayos de colapso de la gota, ácido y gas, no contó con la presencia de exopolisacáridos en la formación de biopelículas, destacando que resultó la de menor tensión interfacial de las estudiadas, siendo indicativo de la presencia de BTA en el medio.

En los ensayos de dispersión del petróleo o colapso de la gota, los resultados que se mostraron bajos o negativos para la producción de biotensoactivo, no indican que exista ausencia de actividad surfactante por parte de los microorganismos en análisis, (Youssef et al., 2004; Fooladi et al., 2016), se sugiere realizar determinaciones de la Tensión Superficial e Interfacial.

CONCLUSIONES

De los ensayos realizados a las trece cepas estudiadas, la No. 241-2 resultó ser la más satisfactoria para evaluar las potencialidades en su empleo en los procesos de MEOR al: contar con la presencia de exopolisacáridos en la formación de biopelículas; resultar positiva al colapso de la gota; ser capaz de producir ácido y gas; presentar mayor halo en la prueba de dispersión del petróleo; y la tensión interfacial se encuentra dentro del rango tomado como base. Para futuras investigaciones fueron descartadas las No. Cepas: 237-1 y 237-2 al no cumplir con ninguno de los requisitos en los ensayos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez J. C., Fernández J. C., Hernández J. L., Castro O. C., Otero R. M. (2004). Informe Final del Pozo Seboruco 7 perforado por PEBERCO. Proyecto 2106. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Camacho L. C y López M. T. (2019). Informe de Yacimientos Seboruco Petraf. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Diéguez, D., Brey, D., Pica, M.E., Perera, C., Rodríguez, E., González, O., González, D., González, A.K., Griñán, I.B. (2021). Actualización del grado de estudio de las investigaciones petroleras en el Sector Seboruco. Proyecto 5011. Etapa 1. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Chávez Jacobo, V. M. (2022). Biopelículas bacterianas, una forma muy compleja de supervivencia y colaboración. *Milenaria, Ciencia Y Arte*, (20), 16–18. <https://doi.org/10.35830/mcya.vi20.319>
- Echevarría, F., Sandoval, F. D., Rodríguez M. N., Ibonet, R. (2018). Valoración de alternativas de métodos de Recuperación Mejorada de Petróleo (RMP). Etapa 2. Proyecto 9034. CEINPET. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Fooladi, T., Moazami, N., Abdesahian, P., Kadier, A., Ghosavand, H., Yusoff, W. y Hamid, A. (2016). Characterization, production and optimization of lipopeptidebiosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 510-519.
- Gorbushina, A. A. (2007). Life on the rocks. *Environmental microbiology*, 9(7), 1613-1631.
- González, F., Sandoval F. E., Veloz J. C., Ibonet R. F. y Hernández, T. (2018). Actualización del modelo estático de seboruco. Proyecto 9034. Etapa 1. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Gudynaite, D., Arnaouteli, S., Bamford, N.C., Kalamara, M. & Stanley Wall N. R. (2022) Bacterial Biofilms: Did You Know They Can Help Us? *Front Young Minds* 10: 626305. <https://doi.org/10.3389/frym.2022.626305>.
- Hernández J. L., Echevarría W. L., Cruz-Martin J. L y Bisbé M. Y. (2014). Informe de Campo. Seboruco-106. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Hernández, M.A., Ojeda, U.M. y Martínez, A. (2019). Recuperación mejorada de petróleo asistida por microorganismos con capacidad de sintetizar biosurfactantes. *Journal of Basic Sciences*. 5 (15), pp. 58-81.
- Linares Cala, E. y cols. (2011). Yacimientos y manifestaciones de hidrocarburos de la República de Cuba. La Habana: Palcograf.
- Mindiola GL, Flores M, Rondón AE. (2021).Factibilidad de la aplicación de la tecnología de recuperación mejorada de hidrocarburos con microorganismos (MEOR) en yacimientos del campo Pílon, distrito Morichal, estado Monagas. *INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD*.) 23(2): e20710539. <https://doi.org/10.25100/iyc.v23i2.10539>.
- Nikolova, C. y Gutierrez, T. (2020). Use of Microorganisms in the Recovery of Oil from Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 10 :2996. doi: 10.3389/fmicb.2019.02996.
- Niu, J., Liu, Q., Jing, L. y Peng, B. (2020). Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 192 (2020) 107350.
- Quraishi, M., Bhatia, S., Pandit, S., Gupta, P., Rangarajan, V., Lahiri, D., Yang, Y.-H. (2021). Exploiting microbes in the petroleum field: Analyzing the credibility of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *Energies*, 14, 4648. doi:<https://doi.org/10.3390/en14154684>.
- San José, C., & Orgaz, B. (2010). Las biopelículas microbianas, un búnker de uso habitual. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Sánchez U. M., García D. M., Ramírez S. T y Bisbé M. Y. (2012). Informe Final pozo Seboruco 140. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.

- Sherritt International (CUBA). (2007). Drilling and Geological Prognosis. Location Seboruco 101RE. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Veloz J. C., Ibonet R. F., Hernández T.G., Velázquez R. V., Barrios M. F. y López O. G. (2019). Actualización de la caracterización de fluidos yacimiento seboruco. Proyecto 9034. Etapa 5. Archivo de documentos del Centro de Investigación del Petróleo.
- Wood, D. A. (2019). Microbial improved and enhanced oil recovery (MIEOR): Review of a set of technologies diversifying their applications. *Advances in Geo-Energy Research*, 3(2), 122-140.

CONTRIBUCIÓN AUTORAL

Mary Elizabeth Sánchez Labrada: Autor principal. Responsable de la ejecución de las mediciones en las estructuras. Acumulación de datos, análisis formal, Redacción del artículo (revisión y edición).

Thais Hernández Gómez: Autor. Gestor de las estructuras para la realización del estudio. Ejecutor de las mediciones, conceptualización, elaboración de datos, análisis formal Redacción del artículo (revisión y edición)

Francisca González Hernández: Autor. Ejecutor de la modelación estadística. Elaboración de tablas y gráficos. Actualización y revisión final del artículo.

Silvia Acosta Díaz: Autor. Ejecutor de la modelación estadística.

María Esther Montalván García: Elaboración de datos, análisis formal

Aysbel Trujillo Crespo: Redacción del artículo (revisión y edición)

En este artículo no existen conflicto de interes entre los autores.