

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**BIOTRATAMIENTO DEL CRUDO EXTRAPESADO CAMPO  
CARABOBO MEDIANTE ENZIMAS EXTRACELULARES DE  
HONGOS MITOSPÓRICOS FILAMENTOSOS**

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por la Br. Suarez S. Lily Y.  
Para optar al Título de  
Ingeniero Químico

Caracas, 2007

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**BIOTRATAMIENTO DEL CRUDO EXTRAPESADO CAMPO  
CARABOBO MEDIANTE ENZIMAS EXTRACELULARES DE  
HONGOS MITOSPÓRICOS FILAMENTOSOS**

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Francisco Yáñez  
TUTOR INDUSTRIAL: Dr. Vladimir León  
CO-TUTOR INDUSTRIAL: Dr. Leopoldo Naranjo

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por la Br. Suarez S. Lily Y.  
Para optar al Título de  
Ingeniero Químico

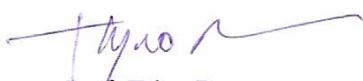
Caracas, 2007

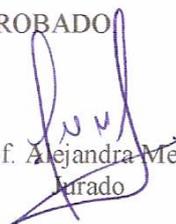
Caracas, julio de 2007

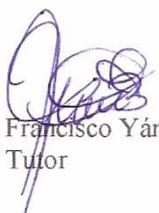
Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Bachiller Lily Ysabel Suárez Santander, titulado:

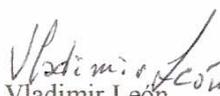
**"Biotratamiento del crudo extrapesado campo Carabobo mediante enzimas  
extra celulares de hongos mitosporicos filamentosos"**

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducen al Título de Ingeniero Químico, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran APROBADO

  
Prof. Trino Romero  
Jurado

  
Prof. Alejandra Meza  
Jurado

  
Prof. Francisco Yáñez  
Tutor

  
Dr. Vladimir León  
Tutor

  
Dr. Leopoldo Naranjo  
Co-Tutor

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Isabel y Nacho las dos personas que más amo en la vida, que me han dado la vida y la fuerza necesaria para llegar hasta aquí.*

*A Dios por iluminarme el camino y permitirme alcanzar todas las metas que me he trazado en la vida. Gracias*

*A mis hermanos Lila, Leny y Johan por quererme y apoyarme en todo momento y porque espero que en su momento disfruten de esta etapa de sus vidas tanto como yo, sin ustedes que son mi familia yo no estaría aquí. A mi querido sobrinito Nicolás por ser un ángel que ha llegado para hacernos más felices.*

*A mis amigas Gaby, Bárbara, Rosa las cuales me apoyaron en todo momento y me hicieron pasar tantos momentos felices en la universidad, siempre las voy a recordar.*

*A mi querido amigo Javier por ser mi amigo incondicional en las buenas y en las malas, ahora faltas tu!. A mi amiga Yamileth por apoyarme en todo momento.*

*Le dedico muy especialmente todo este esfuerzo a mi querido José, por comprenderme, ayudarme y estar a mi lado en las buenas y en las malas, por tenderme tu mano siempre sin titubear y por ser mi compañero inseparable en los momentos más difíciles, esta meta alcanzada es nuestra.*

*Gracias por hacerme tan feliz.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad Central de Venezuela, la casa vence las sombras,  
por ser prácticamente mi hogar a lo largo de todos los años de mi carrera. Gracias.*

*A la Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA., específicamente a la unidad  
de Biotecnología del Petróleo, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi  
Trabajo Especial de Grado en sus instalaciones y bajo su supervisión. Gracias.*

*A mi tutor industrial, Vladimir León y a mi co- tutor industrial Leopoldo Naranjo,  
por su apoyo incondicional y todos los conocimientos transmitidos. Gracias.*

*A mi tutor académico, Francisco Yáñez (Yeyo),  
por tu apoyo incondicional, tus conocimientos transmitidos y por tu buen humor.  
Gracias.*

*Al personal del IDEA, Héctor, Angela, Meralys, Angélica, Spartacus, Emidio,  
Maury, Olaf, Alfonzo y Rosa, por ayudarme y hacerme el tránsito por el laboratorio  
una experiencia única y amena. Gracias.*

*Muy especialmente a José Córdoba por brindarme sus conocimientos de  
manera incondicional y brindarme su ayuda en todo momento. Gracias.*

*A Luis Luis por empaparme siempre de tu buen humor y amenizar mi estadía  
en el laboratorio. Gracias*

**Suarez S., Lily, Y.**

**BIOTRATAMIENTO DEL CRUDO EXTRAPESADO CAMPO CARABOBO  
MEDIANTE ENZIMAS EXTRACELULARES DE HONGOS  
MITOSPORICOS FILAMENTOSOS**

**Tutor Académico: Prof. Francisco Yáñez  
Tutores Industriales: Dr. Vladimir León y Dr. Leopoldo Naranjo**

**Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.  
Año 2007, 140 p.**

**Palabras Claves:** Crudo Extrapesado, Asfaltenos, Biotratamiento, Enzimas  
Extracelulares, Faja del Orinoco

**Resumen.**

El incremento de la demanda mundial de combustibles y la necesidad de mejorar la calidad de vida del venezolano hacen necesario explotar las mayores reservas probadas del mundo de crudos extrapesados (CXP) localizada en la faja petrolífera del Orinoco (FPO). Sin embargo, estos hidrocarburos no convencionales poseen una elevada concentración de moléculas con estructura compleja denominadas asfaltenos, los cuales, ocasionan una serie de problemas operacionales durante los procesos de extracción, refinación y transporte del CXP.

En este sentido, el presente Trabajo Especial de Grado plantea una alternativa biotecnológica que permita el mejoramiento enzimático del CXP, mediante el uso de enzimas oxidativas extracelulares (EOE) del sistema enzimático de degradación de la lignina (SEDL).

Los objetivos planteados en este trabajo consisten en estudiar el potencial de bioconversión de CXP de algunas EOE de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39, y su efecto sobre las propiedades físico-químicas (densidad y composición) del CXP campo Carabobo.

Para el cumplimiento de estos objetivos, en primer lugar, se determinó el potencial de bioconversión de las cepas fúngicas empleadas mediante ensayos fenotípicos y estudios enzimáticos. Para evaluar el efecto de las EOE sobre las propiedades físico-

químicas del CXP campo Carabobo, se llevó cabo la caracterización de muestras de CXP tanto no biotratado como biotratado mediante análisis de densidad, método SARA, y por medio de la destilación simulada para determinar los cambios producidos en sus cortes de destilación.

Los resultados fenotípicos revelaron la alta capacidad de dichos hongos de utilizar diversos hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) como única fuente de carbono y energía, así como de sintetizar EOE. Los estudios enzimáticos mostraron los altos niveles de actividad de las enzimas LiPp y LACp inducidas en las especies BM-04, BM-36 y BM-39, las cuales, fueron seleccionadas para realizar los ensayos de biomejoramiento del CXP. Los resultados obtenidos de la destilación simulada, aplicada a las muestras de CXP biotratadas con la mezcla de LACp durante 20 h y posteriormente sometidas a tratamiento térmico (350 °C), mostraron una conversión enzimática del residuo 500 °C+ hasta un 10 % y un incremento hasta un 15 % en la producción de gasóleo con respecto al control. Así mismo, se logró una ganancia total de combustibles (fuel gain) hasta del 10 % del CXP biotratado con la mezcla de LACp.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la mezcla de LiPp mostraron un bajo potencial de bioconversión del CXP, puesto que logró convertir parte del gasóleo hasta un 15 % de diesel y hasta un 5 % de jet fuel en comparación con el control. Sin embargo, produjo un aumento del residuo 500 °C+ hasta un 10 %. Así mismo, con la mezcla de LiPp se obtuvo una disminución de la cantidad total de combustibles.

En general, el análisis de densidad así como el método SARA mostraron ligeras diferencias entre las propiedades de las muestras de CXP biotratadas con ambas mezclas de enzimas y el control. En conclusión, los resultados revelan el potencial de bioconversión del SEDL sobre el CXP.

**ÍNDICE GENERAL**

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: <i>CONSIDERACIONES GENERALES</i>	3
Planteamiento del problema	3
Objetivos	5
General	5
Específicos	5
CAPÍTULO II: <i>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	6
<i>Aspectos importantes relacionados al crudo extrapesado</i>	6
Breve historia de la faja petrolífera del Orinoco	6
Reservas de crudo a nivel mundial y en Venezuela	8
Calidad de los crudos	9
Crudo extrapesado (CXP)	11
Modelo molecular de un crudo extrapesado	12
Asfaltenos: Problemas ocasionados en la industria	16
Posibles mecanismos de bioconversión de asfaltenos	18
Emulsiones: tipos, composición, estabilidad e importancia en la biodegradación de los crudos extrapesados	21
	23
<i>Tecnologías actuales de mejoramiento de crudos extrapesados</i>	
Proceso de coquificación retardada (CR)	24
Proceso de viscorreducción (Visbreaking)	25
Tecnología HDHPlus®	26
Tecnología AQUACONVERSION®	27
	29
<i>Estrategia de biomejoramiento de crudos extrapesados</i>	
Reducción de la viscosidad	30
Mejoramiento de la composición	31

Eliminación de heteroátomos (S y N)	31
Eliminación de metales (V y Ni)	33
Ruptura de anillos aromáticos	33
Reducción del peso molecular	34
	35
<b><i>Evaluación del mejoramiento sobre las propiedades del crudo extrapesado</i></b>	
Destilación fraccionada de crudos	36
Análisis SARA. El fraccionamiento cromatográfico del crudo pesado y sus residuos	39
Viscosidad y densidad relativa (gravedad API) de un crudo	40
Destilación simulada	40
	41
<b><i>Los hongos y sus características</i></b>	
Clasificación taxonómica de los hongos	43
Factores que afectan el crecimiento de los hongos	43
Lignina: estructura y biodegradación	45
Hongos ligninolíticos	46
Sistema enzimático de degradación de lignina (SEDL) de hongos ligninolíticos	46
Enzimas: catalizadores biológicos	48
Actividad de las enzimas	49
Factores que afectan la actividad enzimática	50
Modelo de actuación de una enzima	52
Clasificación de las enzimas	54
<b>CAPÍTULO III: ANTECEDENTES</b>	55
<b>CAPITULO IV: MARCO METODOLÓGICO</b>	61
<b>CAPITULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	82
Caracterización fenotípica de las cepas fúngicas seleccionadas	82
Producción de enzimas oxidativas extracelulares (EOE) del sistema enzimático de degradación de lignina (SEDL)	86
Efecto del biotratamiento en las propiedades fisico-químicas del CXP	92

Rompimiento de las emulsiones	92
Composición del Crudo: Análisis SARA	94
Gravedad API	98
Destilación simulada	103
CONCLUSIONES	107
RECOMENDACIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	110
ANEXOS	118
Anexo 1: Niveles de actividad enzimática en caldos de cultivo con diversas fuentes de carbono y energía.	118
Anexo 2: Rompimiento de las emulsiones: soluciones acuosas	120
Anexo 3: Determinación de la densidad de cada una de las muestras con y sin tratamiento térmico	121
Anexo 4: Porcentajes de Saturados, Aromáticos y Resinas obtenidos a partir de la cromatografía de adsorción y porcentaje de asfaltenos obtenidos mediante su precipitación por gravedad	127
Anexo 5: Destilación simulada	139

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla N° 1</b> Asociaciones estratégicas, explotación del crudo extrapesado (CXP) y producción de crudo sintético (CS) en la FPO (PDVSA, Plan 2006-2012).	7
<b>Tabla N° 2</b> Clasificación de los crudos según la escala API (Curtis y col., 2002)	10
<b>Tabla N° 3</b> Fracciones de cada uno de los cortes de destilación (Gary, 1980).	37
<b>Tabla N° 4</b> Cantidad total de pruebas aplicadas al proceso de biomejoramiento del CXP campo Carabobo.	79
<b>Tabla N° 5</b> Crecimiento de los hongos en medio de cultivo con diferentes HPAs, CXP y sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	86
<b>Tabla N° 6</b> Porcentaje de conversión del residuo 500 °C+ de las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LACp y LiPp	104
<b>Tabla N° 7</b> Análisis de destilación simulada aplicado a las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LACp.	104
<b>Tabla N° 8</b> Análisis de destilación simulada aplicado a las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LiPp.	105
<b>Tabla N° 9</b> Niveles de actividad enzimática de LiPp, MnPp y LACp en medio de cultivo con diversas fuentes de carbono y energía	119
<b>Tabla N° 10</b> Peso y volumen de los picnómetros	122
<b>Tabla N° 11</b> Medida de la densidad y gravedad API de la muestra biotratada con LACp y sometida a tratamiento térmico.	123
<b>Tabla N° 12</b> Medida de la densidad y gravedad API de la muestra biotratada con LiPp y sometida a tratamiento térmico.	124

---

<b>Tabla N° 13</b>	Medida de la densidad y gravedad API de la muestra biotratada con LACp y sin tratamiento térmico.	125
<b>Tabla N° 14</b>	Medida de la densidad y gravedad API de la muestra biotratada con LiPp y sin tratamiento térmico.	126
<b>Tabla N° 15</b>	Porcentajes de saturados de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (sin tratamiento térmico)	128
<b>Tabla N° 16</b>	Porcentajes de aromáticos de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (sin tratamiento térmico)	129
<b>Tabla N° 17</b>	Porcentajes de resinas de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (sin tratamiento térmico)	129
<b>Tabla N° 18</b>	Porcentajes de asfaltenos de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (sin tratamiento térmico)	130
<b>Tabla N° 19</b>	Porcentajes de saturados de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (sin tratamiento térmico)	130
<b>Tabla N° 20</b>	Porcentajes de aromáticos de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (sin tratamiento térmico)	131
<b>Tabla N° 21</b>	Porcentajes de resinas de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (sin tratamiento térmico)	131
<b>Tabla N° 22</b>	Porcentajes de asfaltenos de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (sin tratamiento térmico)	132
<b>Tabla N° 23</b>	Porcentajes de saturados de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (con tratamiento térmico)	132
<b>Tabla N° 24</b>	Porcentajes de aromáticos de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (con tratamiento térmico)	133
<b>Tabla N° 25</b>	Porcentajes de resinas de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (con tratamiento térmico)	133
<b>Tabla N° 26</b>	Porcentajes de asfaltenos de las muestras biotratadas con la mezcla de LACp (con tratamiento térmico)	134
<b>Tabla N° 27</b>	Porcentajes de saturados de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (con tratamiento térmico)	134

<b>Tabla N° 28</b>	Porcentajes de aromáticos de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (con tratamiento térmico)	135
<b>Tabla N° 29</b>	Porcentajes de resinas de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (con tratamiento térmico)	135
<b>Tabla N° 30</b>	Porcentajes de asfaltenos de las muestras biotratadas con la mezcla de LiPp (con tratamiento térmico)	136
<b>Tabla N° 31</b>	Porcentajes de saturados, Aromáticos y Resinas obtenidos en la cromatografía de adsorción para cada muestra de crudo biotratada con la mezcla de enzima LACp y LiPp	137
<b>Tabla N° 32</b>	Porcentaje de asfaltenos en las muestras biotratadas con LACp y LiPp con y sin tratamiento térmico.	138
<b>Tabla N° 33</b>	Resultados del análisis de destilación simulada aplicado a la muestra de CXP biotratado con LACp por 20 h y sometido a tratamiento térmico	139
<b>Tabla N° 34</b>	Resultados del análisis de destilación simulada aplicado a la muestra de CXP biotratado con LiPp por 20 h y sometido a tratamiento térmico	140
<b>Tabla N° 35</b>	Resultados del análisis de destilación simulada aplicado a la muestra de CXP control y sometido a tratamiento térmico	140

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Recursos de la faja petrolífera del Orinoco (Potellá y Quiroz, 2006)	7
<b>Figura 2</b> Reservas totales de petróleo en el mundo (Alboudwarej y col., 2006)	8
<b>Figura 3</b> Reservas de petróleo (MMMBP) a nivel mundial y en Venezuela (Potellá y Quiroz, 2006)	9
<b>Figura 4</b> Ejemplos de hidrocarburos lineales y ramificados (Wade, 1993)	13
<b>Figura 5</b> Ejemplos de hidrocarburos alicíclicos (Wade, 1993)	13
<b>Figura 6</b> Ejemplos de algunos compuestos aromáticos (Wade, 1993)	14
<b>Figura 7</b> Ejemplos de algunos compuestos policíclicos aromáticos (HPAs) (Wade, 1993)	14
<b>Figura 8</b> Representación de la estructura molecular de los asfaltenos. (A) Un núcleo aromático policíclico condensado; (B) Múltiples núcleos aromáticos policíclicos más pequeños con puentes alifáticos	17
<b>Figura 9</b> Regiones susceptibles a la ruptura y bioconversión en la molécula hipotética de asfaleno. (Pineda y Mesta, 2001)	21
<b>Figura 10</b> Esquema del Proceso de Coquificación Retardada (Marzin, 2002).	24
<b>Figura 11</b> Diagrama del Proceso de Viscorreducción (Visbreaking Process, 2003)	25
<b>Figura 12</b> Diagrama de proceso simplificado HDHPlus ®/SHP (PDVSA, Plan 2006-2012)	27
<b>Figura 13</b> Esquema Aquaconversion® a boca de pozo (Pereira y col., 1999)	28

<b>Figura 14</b>	Esquema general de destilación de crudos (Carbognani y col., 1999)	36
<b>Figura 15</b>	Alternativas viables para el residuo no destilable de crudos pesados (Carbognani y col., 1999).	39
<b>Figura 16</b>	Hifas constituyentes del micelio de un hongo filamentoso (Bartra, 2005)	42
<b>Figura 17</b>	Aspecto del hongo filamentoso <i>Pseudallescheria</i> sp.	42
<b>Figura 18</b>	Estructura química representativa de la lignina (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006)	45
<b>Figura 19</b>	Energía de activación necesaria para que A se transforme en B, con y sin biocatalizador (Sánchez, 2002).	50
<b>Figura 20</b>	Variación de la actividad enzimática en función de la temperatura (Sánchez, 2002)	51
<b>Figura 21</b>	Variación de la actividad enzimática de la enzima A y B en función del pH (Sánchez, 2002)	51
<b>Figura 22</b>	Variación de la actividad enzimática en función de la concentración del sustrato (Sánchez, 2002)	52
<b>Figura 23</b>	Estructura y aminoácidos de fijación en una enzima (Enzimas, 2006)	53
<b>Figura 24</b>	Transformación de un sustrato por acción de una enzima (Sánchez, 2002)	54
<b>Figura 25</b>	Crecimiento del hongo BM-02 a los 14 d en medio mínimo Cz de cultivo con HPAs: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno y d) DBT, así como, e) CXP y f) sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	83
<b>Figura 26</b>	Crecimiento del hongo BM-04 a los 14 d en medio mínimo Cz de cultivo con HPAs: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno y d) DBT, así como, e) CXP y f) sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	83

<b>Figura 27</b>	Crecimiento del hongo BM-36 a los 14 d en medio mínimo Cz de cultivo con HPAs: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno y d) DBT, así como, e) CXP y f) sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	84
<b>Figura 28</b>	Crecimiento del hongo BM-39 a los 14 d en medio mínimo Cz de cultivo con HPAs: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno y d) DBT, así como, e) CXP y f) sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	85
<b>Figura 29</b>	Ensayo colorimétrico con ABTS para detectar cualitativamente la producción de EOE de los hongos: a) BM-02, b) BM-04, c) BM-36, d) BM-39, e) control positivo; y f) control negativo.	88
<b>Figura 30</b>	Actividad enzimática de LACp de las especies BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en caldos de cultivo con afrecho y sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	90
<b>Figura 31</b>	Actividad enzimática de LACp de las especies BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en caldos de cultivo con CXP y sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	91
<b>Figura 32</b>	Actividad enzimática de LiPp de las especies BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en caldos de cultivo con CXP y sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.	93
<b>Figura 33</b>	Actividad enzimática de MnPp de las especies BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en caldos de cultivo con CXP y sacarosa (Control) como únicas fuentes de carbono y energía.	94
<b>Figura 34</b>	Cristales de sal del buffer recuperados en el agua de rompimiento del tratamiento con la mezcla de LiPp (50X de aumento).	96
<b>Figura 35</b>	Porcentaje de asfaltenos contenido en las muestras de crudo biotratadas con la mezcla de LACp y LiPp.	97
<b>Figura 36</b>	Partículas de coque presentes en una muestra de crudo tratada durante 20 h con la mezcla de LACp (100X de aumento)	98

<b>Figura 37</b>	Porcentajes de Saturados, Aromáticos y Resinas (SAR) de las muestras de crudo sin tratamiento térmico obtenidos mediante la cromatografía de adsorción	100
<b>Figura 38</b>	Porcentajes de Saturados, Aromáticos y Resinas (SAR) obtenidos mediante la cromatografía de adsorción de las muestras de crudo biotratadas sometidas a tratamiento térmico	100
<b>Figura 39</b>	Gravedad API de las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LACp y LiP (con y sin tratamiento térmico)	102
<b>Figura 40</b>	Solución acuosa obtenida luego de la ruptura de la emulsión formada por el tratamiento con la mezcla LiPp	116
<b>Figura 41</b>	Solución acuosa obtenida luego de la ruptura de la emulsión formada en el tratamiento con la mezcla LACp	120
<b>Figura 42</b>	Flotabilidad de una gota de crudo en una solución de NaCl de concentración conocida	121
<b>Figura 43</b>	Composición SARA típica en varios crudos pesados y extrapesados venezolanos y sus residuales	127

## **INTRODUCCIÓN**

El crudo extrapesado (CXP) de la faja petrolífera del Orinoco (FPO), contiene altas concentraciones de asfaltenos, resinas, heteroátomos tales como: nitrógeno, azufre y oxígeno (N, S, O) así como varios metales, particularmente níquel y vanadio. Las resinas y los asfaltenos constituyen las fracciones más polares y de mayor peso molecular en este tipo de crudo, siendo responsables de su alta densidad (8-10 °API) y viscosidad, lo cual dificulta su extracción, transporte y refinación por métodos convencionales.

Por otra parte, la disminución de las reservas de crudo convencional, es un factor que estimula el desarrollo de un proceso biotecnológico que logre la transformación del crudo extrapesado en un crudo comerciable y de fácil refinación, reduciéndose, de esta manera, la contaminación ambiental, el consumo de energía en los procesos y la obtención de productos de mejor calidad.

El presente trabajo de investigación plantea el mejoramiento enzimático de los crudos no convencionales de la FPO, mediante la conversión enzimática parcial (CEP) (Tecnología del IDEA) utilizando enzimas oxidativas extracelulares del sistema enzimático de degradación de lignina (SEDL) presente en hongos filamentosos. Estas enzimas catalizan la oxidación de una gran gama de compuestos orgánicos entre los cuales se encuentran: hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), compuestos aromáticos clorados y colorantes, ya que poseen una alta especificidad hacia ese tipo de sustrato. El SEDL incluye un amplio rango de oxidorreductasas, tales como: lacasas y peroxidasas ligninolíticas de alto potencial redox (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa).

Bajo la hipótesis de si estos sistemas enzimáticos extracelulares, llevan a cabo la oxidación parcial de los enlaces internos presentes en los HPAs, así como en las

resinas y asfaltenos, entonces podrán conducir a la bioconversión del CXP, al cambiar sus propiedades físico-químicas y evitando la pérdida de átomos de carbono por lo cual mantiene su poder calorífico. De tal manera, la tecnología limpia de CEP propuesta en el presente trabajo, promoverá un biomejoramiento del crudo, por disminución de su viscosidad, mejorando su composición, disminución de su densidad, beneficiando los procesos a los cuales se somete el crudo posteriormente ya que se necesitarían condiciones de operación menos severas y por ende menos costosas.

De este modo, los objetivos planteados en este trabajo consisten en estudiar la bioquímica parcial de algunas enzimas extracelulares de los hongos mitospóricos filamentosos empleados, y su efecto sobre las propiedades físico-químicas (densidad y composición) del CXP campo Carabobo, para determinar el potencial de conversión de las enzimas oxidativas extracelulares sobre las fracciones más pesadas de los CXP de la FPO.

## **CAPÍTULO I**

### *CONSIDERACIONES GENERALES*

#### ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

El CXP es extremadamente viscoso, contiene altas concentraciones de asfaltenos, resinas, heteroátomos de nitrógeno, azufre y oxígeno así como varios metales, particularmente níquel y vanadio.

En la industria petrolera, las propiedades físico-químicas de los CXP originan serios problemas operacionales tanto en los procesos de extracción, como en la transportación y refinación, ocasionando mayores daños al medio ambiente, requiriéndose más energía en los procesos de refinación y produciéndose una disminución en su eficiencia, lo que trae como consecuencia un menor beneficio económico (León y Kumar, 2006).

Los métodos convencionales utilizados actualmente para reducir la viscosidad y mejorar los CXP (adición de solventes, craqueo térmico, craqueo catalítico, entre otros.) implican grandes costos, son poco selectivos y altamente contaminantes. Por otro lado, la investigación y el desarrollo tecnológico en la industria petrolera esta controlado por varios factores, entre los cuales se encuentran: el cumplimiento de normas nacionales e internacionales ambientales más severas, la creciente demanda mundial de combustibles y la disminución lenta pero constante de las reservas de crudo ligero, lo que ha promovido, el mejoramiento del CXP para satisfacer la demanda energética de la población mundial.

La biotecnología aplicada al petróleo representa una excelente alternativa para afrontar los retos señalados anteriormente debido a la gran versatilidad del

metabolismo microbiano y su habilidad para transformar en condiciones normales de temperatura y presión, sustratos complejos como el CXP.

Por otra parte, existen microorganismos capaces de reciclar el carbón proveniente de la lignina. Estos microorganismos presentan una batería de enzimas poco específicas con un uso potencial en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos. El interés de esta investigación se centra en estos microorganismos, ya que, al ser la lignina un compuesto muy complejo similar a los asfaltenos, se cree que estos microorganismos pueden actuar sobre estas estructuras logrando su bioconversión.

De esta manera se plantea el uso de EOE del SEDL presente en hongos para lograr la posible bioconversión de las complejas estructuras asfálticas del CXP en “condiciones de operación menos severas y con una mayor selectividad hacia reacciones específicas (ruptura y oxidación de los enlaces internos en las moléculas de asfaltenos)”, con el fin de obtener un crudo de menor viscosidad y mejor composición que beneficie los procesos aguas abajo en la industria petrolera.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo General***

Estudiar la bioquímica de las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39, en caldos de cultivo, y su efecto sobre las propiedades físico-químicas del crudo extrapesado campo Carabobo de la faja petrolífera del Orinoco.

### ***Objetivos Específicos***

- Estudiar la actividad enzimática extracelular de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39, en caldos de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía (afrecho y crudo extrapesado) a diferentes tiempos de incubación.
- Determinar las mejores condiciones de incubación (fuente de carbono y energía y tiempo de incubación) donde los hongos producen una mayor actividad enzimática extracelular.
- Seleccionar, aislar y preservar las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 producidas en caldos de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía.
- Determinar y analizar las propiedades físico-químicas del crudo extrapesado campo Carabobo (densidad y composición) antes y después de aplicar el tratamiento biológico con las enzimas extracelulares de hongos filamentosos.
- Realizar el análisis de destilación simulada al crudo extrapesado campo Carabobo luego de aplicar el tratamiento con las enzimas extracelulares de los hongos filamentosos.

## **CAPÍTULO II**

### *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

En este capítulo se presenta la investigación bibliográfica llevada a cabo para la comprensión y el análisis del proceso de biomejoramiento de los CXP de la FPO.

La base teórica de este trabajo comprende principalmente cinco secciones: aspectos importantes relacionados al CXP, tecnologías actuales de mejoramiento de los CXP, estrategia de biomejoramiento de los CXP, evaluación del mejoramiento sobre las propiedades del CXP y finalmente los hongos: características y potencial de bioconversión enzimática parcial (CEP) de los CXP.

#### **Aspectos Importantes Relacionados al Crudo Extrapesado**

##### *Breve Descripción de la Faja Petrolífera del Orinoco*

La FPO está considerada como la mayor acumulación de petróleo pesado y extrapesado en el mundo, estimándose sus reservas en el sitio en 1,5 millones de millones de barriles (MMMMB) de crudo. Se ubica al sur de la Cuenca Oriental del país, específicamente al sur de los estados Guárico, Anzoátegui y Monagas. La FPO mide 460 Km de Este a Oeste y hasta 40 Km de norte a sur, comprendiendo una superficie de 55.314 Km<sup>2</sup>. La faja tiene cuatro áreas principales de producción, las cuales se denominan en sentido Este-Oeste: Carabobo (antes Cerro Negro), Ayacucho (antes Zuata), Junín (antes Hamaca) y Boyacá (antes Machete) (fig. 1), definidas en base a los volúmenes de hidrocarburos en el sitio y a la productividad (Martínez, 2006). En la tabla N° 1 se señalan las asociaciones estratégicas y la producción de crudo sintético (CS) en cada una de estas áreas de producción.

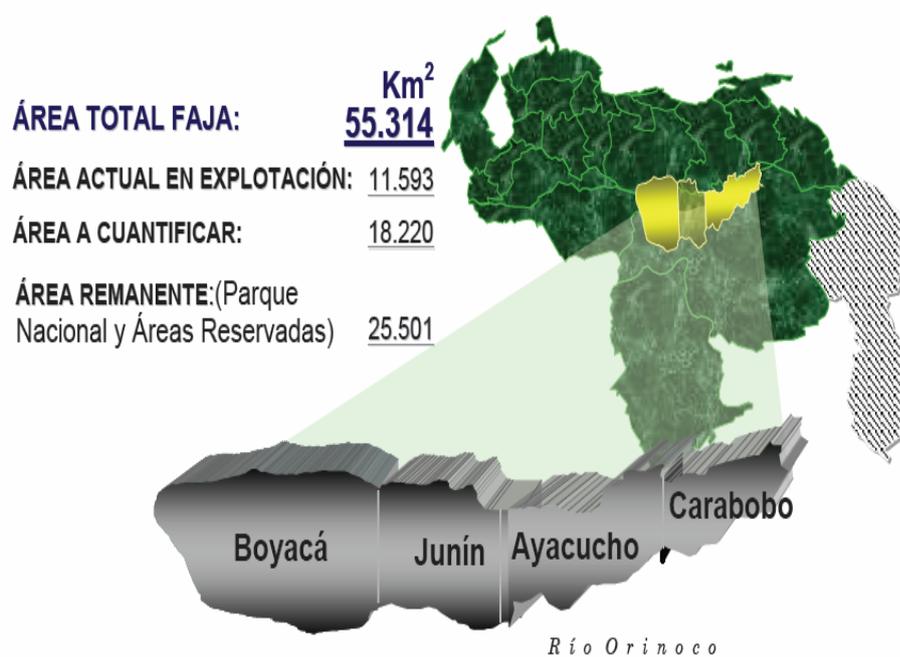


Figura 1. Recursos de la faja petrolífera del Orinoco (Potellá y Quiroz, 2006)

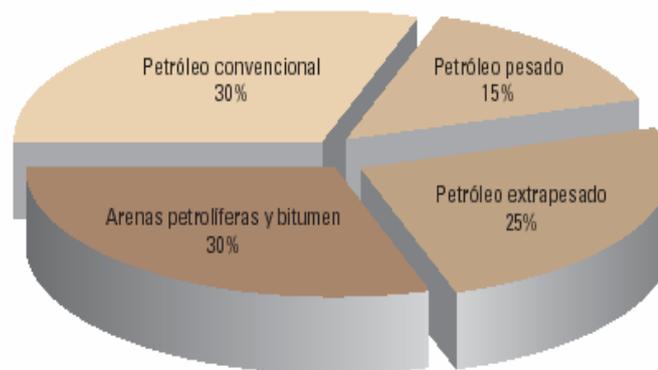
Tabla N° 1. Asociaciones estratégicas, explotación del crudo extrapesado (CXP) y producción de crudo sintético (CS) en la FPO (PDVSA, Plan 2006-2012).

Área de Producción	Asociación Estratégica	CXP (MBD)	CS (MBD)	Gravedad °API
CARABOBO	PDVSA 41,67%	117	105	15
	EXXONMOBIL 41,67%			
	VEBA OEL 16,67%			
AYACUCHO	PDVSA 49,9%	120	102	20
	CONOCO-PHILLIPS 50,1%			
JUNÍN	PDVSA 30%	190	180	25
	CONOCO-PHILLIPS 40%			
	CHEV-TX 30%			
BOYACÁ	PDVSA 38%	192	169	30
	TOTALFINAELF 47%			
	STATOIL 15%			

Diariamente los requerimientos energéticos y las expectativas económicas aumentan vertiginosamente, por lo que se hacen insuficientes los volúmenes de petróleo provenientes de las áreas tradicionales. Partiendo de la premisa de que la FPO es la única fuente significativa de reemplazo ante la declinación de los campos petroleros “tradicionales” de Venezuela, es necesario desarrollarla completamente, lo que mantendrá a Venezuela como un suplidor confiable, desde el comienzo de la explotación de sus hidrocarburos (Martínez, 2006).

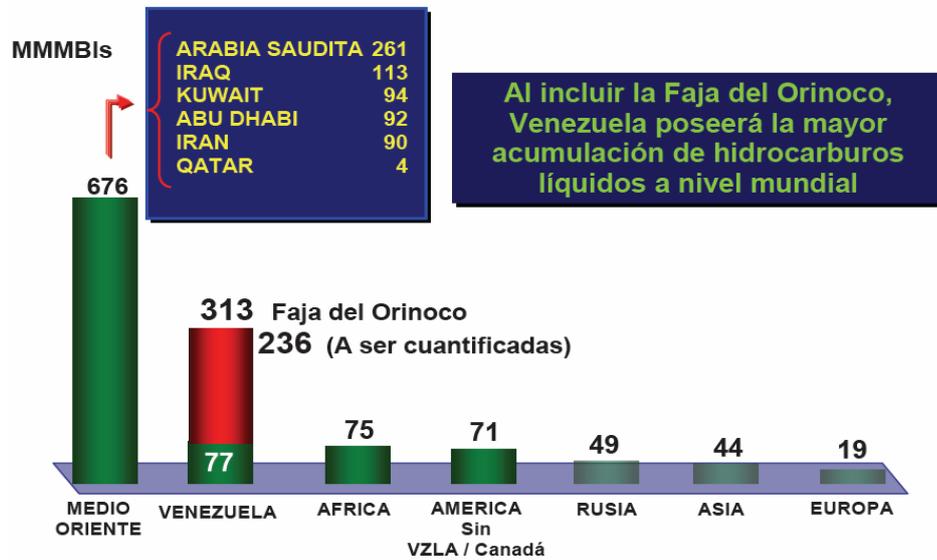
### ***Reservas de Crudo a Nivel Mundial y en Venezuela***

El petróleo pesado, extrapesado y el bitumen conforman aproximadamente un 70% de los recursos totales de crudo en el mundo (fig. 2), los cuales, oscilan entre 9 y 13 millones de millones de barriles (MMMMB) (Alboudwarej y col., 2006).



**Figura 2.** Reservas totales de petróleo en el mundo (Alboudwarej y col., 2006)

Las reservas de petróleo de Venezuela son las más grandes del continente, y se estiman en 77 mil millones de barriles (MMMMB) de crudo, lo cual representa el 52% de las reservas del continente americano, y el 7,6% de las reservas del mundo (fig. 3). Esta cifra no incluye las reservas de crudos pesados y extrapesados de la FPO que actualmente se aproximan a los 300 mil millones de barriles adicionales (PDVSA, Plan 2006-2012).



**Figura 3:** Reservas de petróleo (MMMBP) a nivel mundial y en Venezuela (Potellá y Quiroz, 2006)

El petróleo *in situ* de la FPO se estimó en 1,5 millones de millones de barriles (MMMMB), de los cuales 300 mil millones (MMMMB), es decir 20% es recuperable, por lo que la FPO es de una magnitud tal, que garantiza al país su presencia como un exportador de primera importancia en el futuro (PDVSA, Plan 2006-2012).

**Calidad de los Crudos**

La calidad del petróleo se fundamenta en su densidad relativa, la cual se mide según sean más livianos o pesados que el agua. Mientras más liviano es un crudo, mejor es su calidad y mayor es su precio.

*La densidad relativa* se considera como el cociente de dos densidades; la sustancia de interés entre la sustancia de referencia. La sustancia de referencia en el caso de los líquidos y sólidos generalmente es el agua. La mayoría de los crudos tienen densidades menores al agua. Por convención, el Instituto Americano del Petróleo, mide la densidad relativa del petróleo en grados API (American Petroleum Institute, por sus siglas en inglés) (Himmelblau, 1997). La fórmula que relaciona la gravedad

específica S.G. (*Specific Gravity*, por sus siglas en ingles) con la densidad API es la siguiente:

$$^{\circ}API = \frac{141.5}{S.G. \frac{60^{\circ}F}{60^{\circ}F}} - 131.5 \quad (1)$$

El volumen, y por tanto la densidad, de los productos del petróleo varía con la temperatura, y la industria petrolera ha establecido los 60 °F (15,55 °C) como la temperatura estándar para el volumen y la gravedad específica API (Himmelblau, 1997). En la escala API el agua tiene 10 °API, un crudo menos denso que el agua tiene más de 10 °API y uno con densidad mayor tiene menos de 10 °API y se denominan extrapesados (tabla N° 2).

**Tabla N° 2.** Clasificación de los crudos según la escala API (Curtis y col., 2002)

Tipo de Crudo	Rango (°API)
Condensados	42,0 < en adelante
Livianos	30,0 < °API < 41,9
Medianos	22,0 < °API < 29,9
Pesados	10,0 < °API < 21,9
Extrapesados	Por debajo < 9,9

El Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE), define al petróleo pesado como aquel que presenta una gravedad API entre 10,0 y 22,3 °API (Curtis y col., 2002). En el caso de los crudos de la FPO, estos son tan pesados que se hunden en el agua y por su elevada viscosidad se dificulta mucho su manejo. Debido a ello, antes de los desarrollos tecnológicos de las últimas décadas, la explotación del crudo de la

faja era considerada por muchos imposible, dado que estaba muy lejos de ser un negocio rentable. Sin embargo, los avances tecnológicos han permitido reducir considerablemente los costos de extracción, así como aminorar el impacto ambiental de esta actividad (Martínez, 2004).

Otro parámetro físico importante que determina la calidad de un crudo es la *viscosidad dinámica*, la cual se define como la propiedad de un fluido que tiende a oponerse a su flujo cuando se le aplica una fuerza. Los fluidos de alta viscosidad presentan una cierta resistencia a fluir; los fluidos de baja viscosidad fluyen con facilidad. La fuerza con la que una capa de fluido en movimiento arrastra consigo a las capas adyacentes de fluido determina su viscosidad (Himmelblau, 1997). Su unidad de medición común es el poise (P). Cuando la viscosidad es pequeña, su valor se expresa en *centipoise*. A medida que los crudos son más densos son más viscosos. Como la viscosidad depende de la temperatura, se puede disminuir mediante calentamiento (Curtis y col., 2002)

### ***Crudo Extrapesado (CXP)***

El CXP es extremadamente viscoso, contiene altas concentraciones de asfaltenos, resinas y heteroátomos tales como: nitrógeno, azufre y oxígeno así como metales (V y Ni). Los crudos extrapesados y los residuos de vacío constituyen una mezcla compleja de componentes de diferentes propiedades y estructuras moleculares, con interacciones físicas importantes que le confieren propiedades específicas, como por ejemplo altas viscosidades a temperatura ambiente.

Con la gran demanda de crudos, sus altos precios y estando en declinación la producción de la mayoría de los yacimientos de petróleo convencionales a nivel mundial (Alboudwarej y col., 2006), la atención de la industria petrolera venezolana se está desplazando hacia la explotación de petróleo pesado y extrapesado, ya que este tipo de crudo promete desempeñar un rol muy importante en el futuro de la

industria petrolera venezolana. Venezuela se vislumbra como el país con las mayores reservas de crudo probadas a nivel mundial (una vez certificado el volumen en la FPO), por tal motivo se persigue en la actualidad incrementar su producción, evaluar las estimaciones de reservas, comprobar las nuevas tecnologías e invertir en infraestructura para aprovechar este gran recurso (Martínez, 2004).

### ***Modelo Molecular de un Crudo Extrapesado***

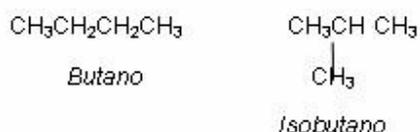
El modelo molecular de un crudo debe permitir la descripción del comportamiento del mismo en diversas condiciones físicas, así como predecir su evolución en cualquier proceso. De forma general, cada molécula de un crudo está compuesta de dos unidades básicas: una parte aromática, común a todos los crudos, que en su mínima unidad corresponde a un anillo aromático denominado *tronco* y otra unidad constituida por saturados (parafinas y nafténicos), característica de cada crudo, o de cada corte de destilación y la cual se denomina *rama*. La rama en su forma básica corresponde a una cadena alifática. Las moléculas del crudo corresponden a las combinaciones posibles de troncos y ramas, en especial, los pesos moleculares característicos de las fracciones más pesadas no pasan de 1500 Daltons (Da) (León, 2001).

Muchas ramas con pocos troncos constituyen los saturados, a medida que aumenta el número de troncos por molécula se constituyen sucesivamente los aromáticos, las resinas y los asfaltenos. La proporción de cada una de estas familias de moléculas constituye otra de las características específicas del crudo. En el caso del coque, material carbonoso que se obtiene a partir de procesos de coquificación de las fracciones pesadas de crudo, el cual se caracteriza por tener bajo contenido de cenizas, ser insoluble en agua y físicamente duro, quebradizo, poroso y de color variable entre gris y negro, corresponde casi en su totalidad a troncos y muy pocas ramas (León, 2001).

De esta forma, las moléculas más complejas pueden describirse como constituidas por un núcleo aromático, el cual consta de 3 a 10 anillos, con sustituciones nafténicas y parafínicas que conforman la parte saturada. Es importante señalar, que esta parte no es más compleja que el corte de saturados provenientes del crudo, ya que su relación hidrógeno/carbono (H/C) es similar.

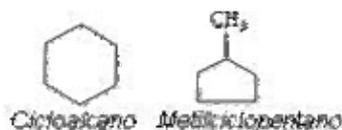
(a) **Saturados:** Los hidrocarburos saturados son los compuestos más valiosos encontrados en el petróleo y en la mayoría de los derivados. En su estructura poseen enlaces simple C-C (con los otros enlaces saturados con átomos de H). Las moléculas pueden estar ordenadas en diversas configuraciones (Wade, 1993):

*Alifáticos:* lineales o ramificados (fig. 4), con la fórmula general:  $C_nH_{2n+2}$ . Los nombres comunes para este tipo de compuestos son alcanos e isoalcanos. La industria del petróleo se refiere a estos compuestos como parafinas e isoparafinas respectivamente.



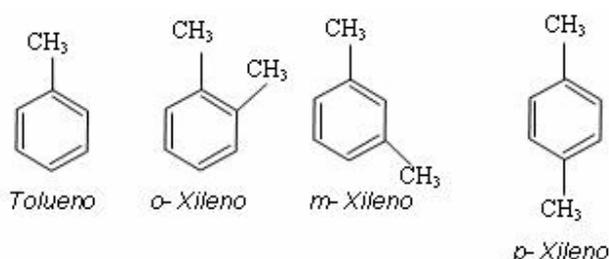
**Figura 4.** Ejemplos de hidrocarburos lineales y ramificados (Wade, 1993)

*Alicíclicos:* compuestos cíclicos con la formula general:  $C_nH_{2n}$ . Estos compuestos son hidrocarburos saturados que contienen uno o más anillos los cuales pueden también estar unidos a cadenas saturadas (fig. 5). Son también llamados cicloalcanos. La industria del petróleo los denomina comúnmente naftenos o cicloparafinas.



**Figura 5.** Ejemplos de hidrocarburos alicíclicos (Wade, 1993)

(b) **Aromáticos:** Los compuestos aromáticos son una clase especial de hidrocarburos insaturados. La estructura de estos compuestos se basa en la estructura del anillo del benceno. La molécula de benceno puede tener uno o más átomos de hidrógeno sustituidos por radicales alquilo, originando alquil bencenos (fig. 6); o puede haber dos o más anillos aromáticos fusionados dando como resultado hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) (fig. 7).



**Figura 6.** Ejemplos de algunos compuestos aromáticos (Wade, 1993)



**Figura 7.** Ejemplos de algunos compuestos policíclicos aromáticos (HPAs) (Wade, 1993)

(c) **Resinas:** Son constituyentes no volátiles del crudo, que pueden ser desorbidos de la alúmina absorbente CG calcinada, después que los saturados y naftenos aromáticos han sido removidos, utilizando tolueno y tricloroetileno como eluyentes en las condiciones específicas de separación (ASTM-D-4124-01, 2001).

(d) **Asfaltenos:** Los asfaltenos son hidrocarburos que presentan una estructura molecular bastante compleja y están constituidos por moléculas poliaromáticas y policíclicas que contienen heteroátomos (S, N, O), además poseen metales como V y

Ni. El contenido de compuestos aromáticos está entre 40-60 % cuya relación atómica H/C esta comprendida en el rango de 1-1,2 (Alayón, 2004).

Los heteroátomos (S, N, O) existen en una proporción que es característica de cada crudo, se encuentran mayoritariamente asociados a los troncos, el número por molécula es proporcional al número de troncos, de esta forma los asfaltenos tienen el mayor número de heteroátomos, seguidos por las resinas, siendo importante destacar que en la fracción de aromáticos hay pocos heteroátomos. En el caso de las fracciones más pesadas del CXP del campo Carabobo, se determinó que en promedio hay dos heteroátomos por molécula de asfalteno (de más de 150 átomos).

En la fracción de crudo destilable hasta 500 °C del campo Carabobo, está contenido un 10 % del total de los metales vanadio y níquel (V, Ni), y de esta cantidad un 60% se encuentra en estructuras porfirínicas. La mayoría de los metales se encuentran en el residuo y no están asociados a porfirinas, al menos a porfirinas típicas detectables por el método convencional de identificación (absorción óptica) (León, 2001).

Estudios recientes de las fracciones con mayor contenido de vanadio, residuo 700 °C + del crudo Campo Carabobo, arrojaron como resultado la existencia de familias de moléculas con un núcleo porfirínico, las cuales, no habían sido detectadas anteriormente por los métodos convencionales, sin embargo, el estudio se concentró en la caracterización de moléculas con vanadio y se encontró que este metal pudiese estar asociado en gran medida a estructuras complejas con núcleos porfirínicos. Aún en los crudos más pesados, con un alto contenido de vanadio y níquel, se estima que hay apenas un metal por cada 30 ó 50 moléculas, por lo que se deduce su poca influencia en la estructura molecular del mismo (León, 2001).

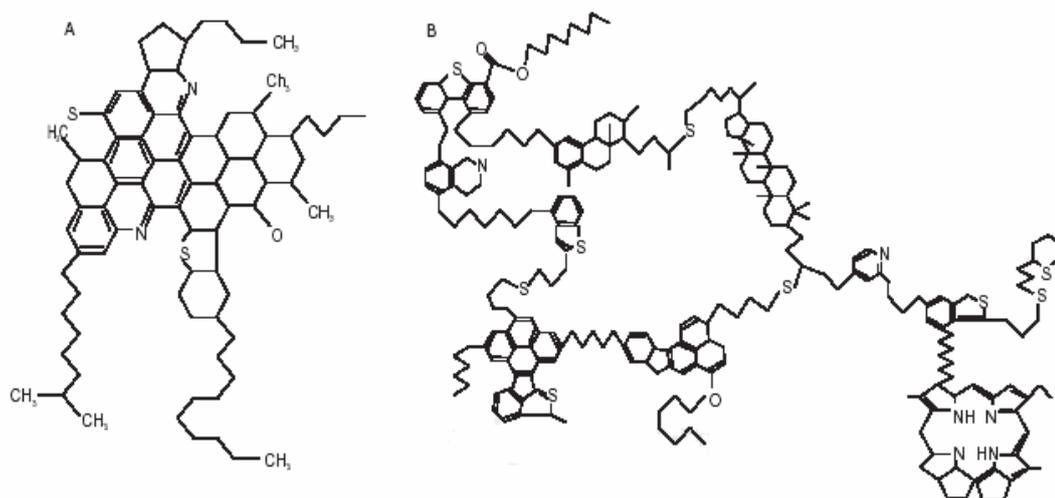
***Asfaltenos: Problemas Ocasionados en la Industria***

Los asfaltenos son la fracción del petróleo de mayor peso molecular y de mayor polaridad, son materiales sólidos, de apariencia fina como polvo, amorfos, oscuros y están dispersos coloidalmente en el crudo representando una fracción en masa de 0-10 % ó más (Groenzin y Mullins, 1999; Centeno y col., 2004). El azufre en los asfaltenos se encuentra principalmente en tiofenos y sulfuros, así como también existe una pequeña cantidad en los sulfóxidos. El nitrógeno se encuentra en anillos aromáticos pirrólicos (predominantemente) y piridínicos (Groenzin y Mullins, 1999). Además posee metales como níquel y vanadio (Ni y V). Los asfaltenos se obtienen a partir de residuos del petróleo convencional, petróleo pesado y extrapesado, o materiales bituminosos (Centeno y col., 2004).

Los asfaltenos son definidos en base a una clasificación en términos de solubilidad y no por su estructura química, ello se debe en parte a los métodos empleados para aislar los asfaltenos del crudo y a la dificultad de definir completamente las propiedades moleculares de los asfaltenos (Groenzin y Mullins, 1999). Operacionalmente se definen como “*la parte del petróleo pesado insoluble en n-alcános (como n-pentano y n-heptano) pero soluble en tolueno*” (Pineda y Mesta, 2001). El material asfáltico no tiene punto de fusión y se descompone por encima de los 420°C (Centeno y col., 2004). Varios estudios realizados indican que los asfaltenos poseen pesos moleculares no mayores a 1500 Da (León y Kumar, 2005), y más específicamente entre 600 y 1000 Da (Sheu, 2002). La variación del peso molecular en el crudo se debe a fenómenos de asociación intermolecular entre sus moléculas. Estas fuerzas de atracción intermolecular aumentan a medida que las moléculas son más grandes. (Centeno y col., 2004).

Existen dos puntos de vista diferentes sobre la estructura molecular de los asfaltenos. El primero representa a los asfaltenos constituido por un único núcleo aromático policíclico condensado largo, con cadenas alifáticas unidas sobre la periferia (fig. 8A)

(Speight y Moschopedis, 1981). Este tipo de estructura, sin embargo, no explica todas las propiedades físicas y químicas de los asfaltenos. La segunda representación describe a los asfaltenos constituidos por múltiples núcleos aromáticos policíclicos más pequeños, de 2-4 anillos unidos por puentes alifáticos de longitudes variables (fig. 8B) (Murgich, Abanero y Strausz, 1999). Se han identificado sulfuros, éteres y ésteres como estructuras de enlaces comunes en los puentes alifáticos encontrados en asfaltenos. Esta última visión es la más aceptada entre los investigadores, porque, permite explicar algunas de las propiedades físicas y químicas observadas en los asfaltenos (Kirkwood y col., 2004).



**Figura 8.** Representación de la estructura molecular de los asfaltenos. (A) Un núcleo aromático policíclico condensado; (B) Múltiples núcleos aromáticos policíclicos más pequeños con puentes alifáticos

En los CXP se tienen interacciones moleculares características (básicamente interacciones de Van der Waals), las cuales son mínimas para moléculas pequeñas, y grandes para asfaltenos, manteniéndose estos últimos muy bien unidos. A baja temperatura ( $<60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), estos contactos cercanos son más comunes y ocasionan un aumento de la viscosidad del crudo. Otras interacciones moleculares responsables del aumento de la viscosidad son las que ocurren entre los radicales libres, los cuales

están asociados con estructuras aromáticas policíclicas con electrones desapareados que son altamente reactivas. Estas estructuras participan en la formación de complejos metálicos, reacciones inter e intra moleculares, rearrreglos moleculares y puentes de hidrógeno. Los efectos combinados de las funcionalidades mencionadas juegan un papel decisivo en el comportamiento de los crudos dentro del reservorio así como también en los procesamientos aguas arriba y aguas abajo (León, 2001).

Los asfaltenos se consideran como los componentes de menor valor de un CXP, ya que causan un marcado aumento de su viscosidad, haciéndolo difícil de transportar y de procesar. Debido a sus características no son refinables, generando diversos problemas en su manejo, tales como: taponamiento en equipos, precipitación en oleoductos, iniciadores y/o motivadores de formación de coque en los procesos catalíticos ocasionando una desactivación importante en los catalizadores, envenenamiento de los catalizadores debido a la presencia de metales pesados y contaminación ambiental. Por lo antes expuesto, ellos pueden considerarse los compuestos más indeseables desde el punto de vista del tratamiento de los residuos del petróleo (Pineda y Mesta, 2001).

Todas estas desventajas en la producción y procesamiento del crudo y de sus fracciones, aunado a la tendencia de producir y refinar crudos cada vez más pesados, han incentivado los proyectos de investigación de la físico-química de los asfaltenos en la industria petrolera, los cuales se han incrementado durante los últimos años, con el fin de encontrar alternativas de cómo eliminar o disminuir estos compuestos de los crudos antes de su transporte y de su entrada al proceso de refinación (Centeno y col., 2004).

### ***Posibles Mecanismos de Bioconversión de Asfaltenos***

Cuando los microorganismos que residen en el ambiente desarrollan completamente su potencial metabólico, pueden tener la capacidad de utilizar los asfaltenos como fuente de carbono y energía. Esto es posible debido a que estos compuestos contienen carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno y oxígeno, elementos necesarios para el desarrollo de estos organismos (Nishijima, Shoto y Okada, 1997). De acuerdo con los estudios relacionados a la degradación de asfaltenos parecería que estos compuestos no son susceptibles a ser degradados por la actividad microbiana (Premuzic y col., 1999), sin embargo, es posible proponer algunos mecanismos de biodegradación, basados en la estructura química que presentan y los procesos de degradación biológica conocidos para otros hidrocarburos de estructura compleja (Pineda y Mesta, 2001)

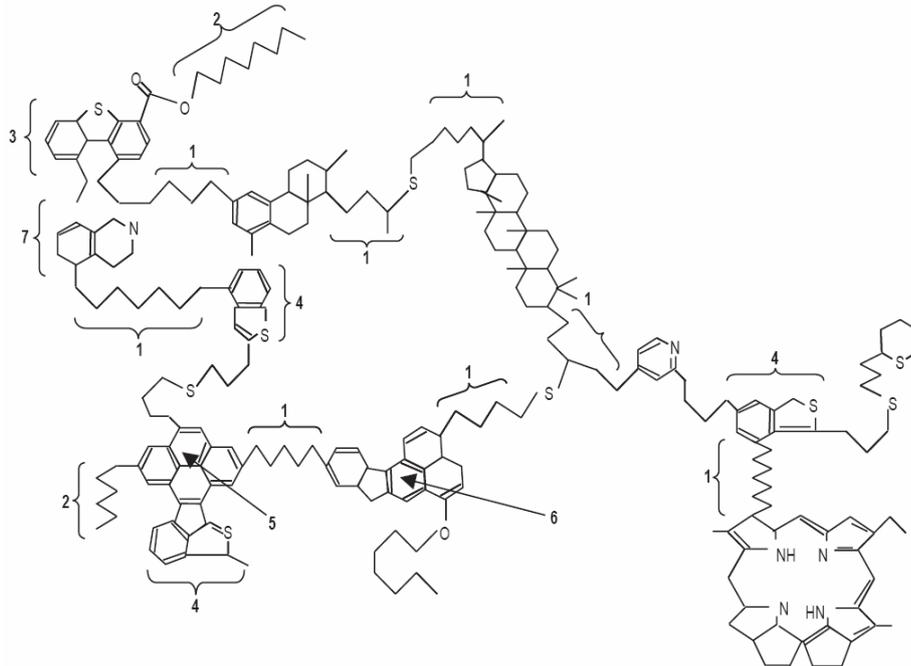
Debido a la estructura relativamente simple de los alcanos lineales, se cree que estos compuestos son los primeros en ser bioconvertidos a través de procesos de  $\omega$ -oxidación y  $\beta$ -oxidación, los cuales son procesos bioquímicos ampliamente distribuidos en los microorganismos. En el caso de los alcanos ramificados, su degradación es un proceso más lento que la de los alcanos lineales. Por otra parte, se ha demostrado que los hidrocarburos heteropoliaromáticos (HPAH) pueden inhibir la bioconversión de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) especialmente de benzopireno, por encima del 37 %, de manera que es posible que HPAH puedan ser los primeros en ser degradados (Meyer y Steinhart, 2000).

Los HPAH constituidos por nitrógeno pueden ser los primeros en ser degradados, luego los de oxígeno y finalmente los de azufre. En el caso de HPAH nitrogenados y sulfurados se ha demostrado que varios microorganismos tales como *Ralstonia* sp., pueden utilizar carbazol (N-HPAH) como única fuente de carbono y energía, del mismo modo *Brevibacterium* sp., *Pseudomonas* sp. y *Rhodococcus erythropolis* pueden usar dibenzotiofeno (S-HPAH) y benzotiazol (N-S-HPAH), también como

únicas fuentes de carbono, azufre, nitrógeno y energía, respectivamente (Pineda y Mesta, 2001).

Una vez que la concentración de HPAH disminuye, la biodegradación de HPAs empieza a incrementarse en una proporción importante, primero para aquellos que poseen tres anillos aromáticos, luego para aquellos con cuatro y así sucesivamente. Los HPAs de tres anillos, antraceno y fenantreno han sido los más estudiados, y se ha demostrado que la biodegradación de ambos supera el 70 % en 11 días. Con respecto a los compuestos con más de tres anillos la eliminación aumenta con el tiempo. En el caso del pireno, un HPA de cuatro anillos, se ha demostrado que el mismo es degradado por encima de un 60 % por microorganismos que fueron aislados de muestras de suelos contaminados por hidrocarburos (Pineda y Mesta, 2001).

Finalmente, en la figura 9 se muestra una estructura molecular promedio de los asfaltenos y las regiones susceptibles de ser bioconvertidas. Aproximadamente el 50 % de la molécula de asfalteno puede ser degradada por la actividad de los microorganismos, siempre y cuando las fracciones de saturados, aromáticos y resinas hayan sido previamente minimizadas en el crudo por medio de la bioconversión (Pineda y Mesta, 2001).



**Figura 9.** Regiones susceptibles a la ruptura y bioconversión en la molécula hipotética de asfalteno. (Pineda y Mesta, 2001)

Al ser las moléculas de asfaltenos de una elevada complejidad, estas tienden a formar agregados dentro del crudo, por otro parte, algunos de los microorganismos encargados de la biodegradación excretan enzimas al medio, las cuales requieren de un cierto contenido de agua para funcionar adecuadamente. Por lo tanto, a fines de aumentar el potencial de biodegradación de estos microorganismos en cualquier proceso de biomejoramiento es necesario aplicar procedimientos físicos alternos, tal como la formación de emulsiones crudo/agua, fenómeno que puede mejorar el contacto entre el crudo y el biocatalizador (Córdova y col., 2004).

***Emulsiones: Tipos, Composición, Estabilidad e Importancia en la Biodegradación de los Crudos Extrapesados***

La capacidad de las células para interactuar físicamente con los componentes del crudo en la interfase crudo-agua ha sido un tema de investigación en los estudios de

bioprocesamiento. Por tal motivo, se ofrece a continuación un análisis breve de estos sistemas físicos conocidos como *emulsiones*.

Las emulsiones se forman a partir de dos fases inmiscibles (agua / aceite) a través del mezclado para producir una dispersión fina de gotas de una fase en la otra, donde la interfase es estabilizada por agentes emulsificantes o surfactantes. La energía que se añade durante la mezcla es esencial, puesto que el estado emulsificado no es termodinámicamente estable. Los agentes emulsificantes asociados a la interfase promueven la estabilidad cinética impartida a la emulsión, ya sea a través de la reducción de la tensión interfacial o por suministro de una barrera a la coalescencia de las gotas (Kirkwood y col., 2004). Una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable y tarde o temprano (lo cual puede variar de unos minutos a algunos años), debe separarse en dos fases. La estabilidad de la emulsión depende del tamaño de las gotas, y a partir de cómo haya sido preparada la emulsión (particularmente de las condiciones mecánicas con las cuales se han producido las gotas) esta contendrá gotas de tamaños similares o muy diferentes, cercanos o muy alejados al tamaño óptimo de estabilidad (Salager, 1999).

En las aplicaciones prácticas se encuentra una concentración de agentes emulsificantes (surfactante) en el rango 0,2-3 %. Por debajo del valor mínimo, la cantidad de surfactante no es suficiente para estabilizar la emulsión y por encima del valor máximo la estabilidad de la emulsión no mejora aumentando la concentración del surfactante. De este modo, una cantidad de surfactante dentro del rango recomendado estabiliza la emulsión retardando la coalescencia de las gotas de la fase dispersa (Salager, 1999).

Las emulsiones de crudo en agua (o/w) son sumamente importantes para el proceso de degradación biológica, sobre todo de las fracciones más pesadas, debido a la gran problemática que ocasionan las moléculas de asfaltenos durante estas transformaciones. Las velocidades de transformación de estas grandes moléculas, se

ven limitadas por la transferencia de masa de moléculas específicas hacia el biocatalizador y, en el caso de células enteras, por el paso de estas moléculas a través de la membrana celular. La transferencia de masa interfacial podría ser mejorada por medio de la emulsificación, ya que de este modo, se aumenta el área de contacto interfacial entre la gota de crudo y la fase acuosa donde se encuentra el microorganismo encargado de la degradación (Kirkwood y col., 2004). Sin embargo, al ser estas grandes moléculas excesivamente hidrofóbicas, las limitaciones en la transferencia de masa son anticipadas por las reacciones en fase acuosa (León y Kumar, 2005).

### **Tecnologías Actuales de Mejoramiento de Crudos Extrapesados**

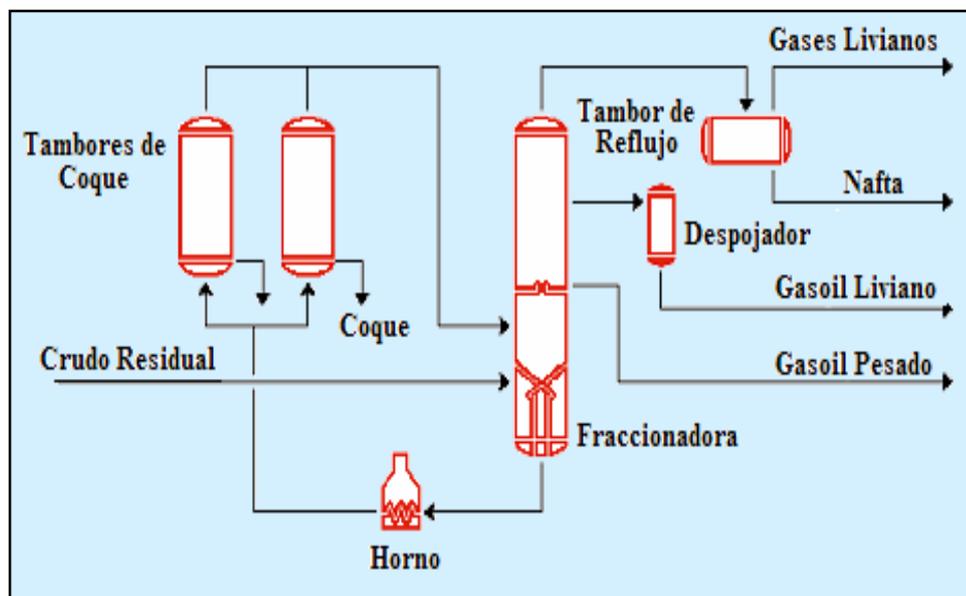
Los CXP poseen ya sea un exceso de carbono o una deficiencia de hidrógeno. En respuesta a esta realidad, se han producido dos vías tecnológicas para el mejoramiento de este tipo de crudo: las de rechazo de carbón, tales como coquificación retardada (CR) y *flexicoking*, siendo la primera de amplio uso en el circuito refinador venezolano, a partir de la cual se produce un crudo sintético comercializable entre 19° y 25° API. El principal problema que ocasiona la CR, son las grandes cantidades de coque generadas, necesitándose instalaciones adicionales para su manejo y posterior comercialización, lo cual limita en un futuro su aplicación extensiva (Pereira y col., 1999).

En el otro extremo se encuentran las tecnologías sin rechazo de carbón, las que se subdividen en térmicas, como viscorreducción o *visbreaking*, y de hidrogenación e hidrocrqueo, las que generan productos más limpios que la CR y muy poca cantidad de subproductos, tales como: S, metales y coque (Pereira y col., 1999).

A continuación se describirán brevemente las tecnologías de mejoramiento del CXP empleadas en los procesos de refinación venezolanos; coquificación retardada, viscorreducción, aquaconversion® y próximamente HDHPlus®.

**Proceso de Coquificación Retardada (CR)**

La coquificación retardada es una forma severa de craqueo térmico utilizada para obtener nafta (nafta de coquificación), diversas fracciones de destilación intermedia y el residuo formado es una forma de carbón, denominado coque. Las unidades de CR están constituidas generalmente por tres componentes fundamentales: i) fraccionadora principal, ii) hornos; y iii) tambores de coquificación. En una unidad de CR, la alimentación se precalienta a velocidad elevada en un horno hasta una temperatura que oscila entre 480 y 510 °C, para luego pasarla a los tambores de coquificación, en donde tienen lugar las reacciones químicas, principalmente craqueo térmico (Gary, 1980). Los vapores que salen por el tope de dichos tambores van al fraccionador principal para ser separados en diferentes productos y, el coque sólido remanente en los tambores es removido usando agua a alta presión (fig. 10).

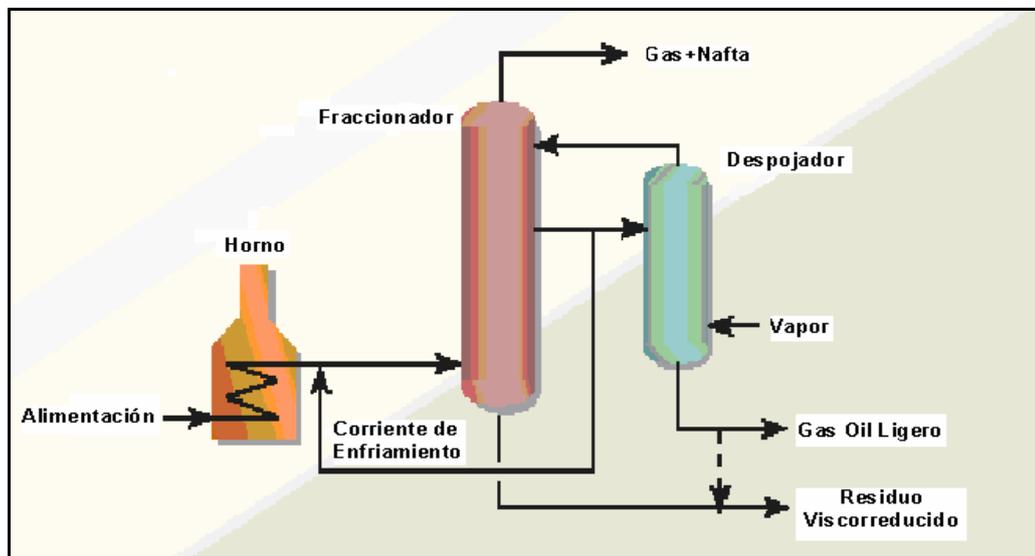


**Figura 10.** Esquema del Proceso de Coquificación Retardada (Marzin, 2002).

A nivel mundial existen otras tecnologías comerciales que compiten con la coquificación retardada, podemos identificarlas como: H-oil, LC-Fining, Aurabon de UOP, VCC, Canmet, Shell Hycon, HDHPlus®, Aquaconversion® etc., las cuales son de mayor conversión en comparación a la CR. Todas estas tecnologías implican la adición de hidrógeno para aumentar la producción y calidad de los productos líquidos y reducir la producción de coque en el proceso (Morales, 2005).

### **Proceso de Viscorreducción (Visbreaking)**

La viscorreducción es un proceso térmico no catalítico que convierte los residuos atmosféricos y de vacío en gas, nafta, destilados y residuos viscorreducidos (fig 11). Típicamente el proceso alcanza una conversión a gas, nafta y destilados del 10 % y en algunos casos se pueden obtener conversiones más elevadas, dependiendo de las características de la alimentación. Durante este proceso se puede disminuir la producción de fuel oil (hasta en un 20 %) dependiendo de la cantidad de azufre contenido en la alimentación (Visbreaking Process, 2003).



**Figura 11:** Diagrama del Proceso de Viscorreducción (Visbreaking Process, 2003)

En este proceso la conversión esta limitada por el contenido de asfaltenos. Una alimentación con un elevado contenido de asfaltenos limitará la conversión total posible de esta carga disminuyendo así la producción de fuel oil.

En vista de los mayores porcentajes de conversión del CXP alcanzados con tecnologías de adición de hidrógeno, se han generado en nuestro país extensas actividades de investigación y desarrollo, en los últimos 20 años. A partir de diversas pruebas de escalamiento y evaluación con diferentes crudos de la FPO, se lograron desarrollar dos tecnologías nacionales, HDHPlus® y Aquaconversion®. Ambos procesos catalíticos (siendo HDHPlus® de mayor severidad), cuyo objetivo es intervenir adecuadamente en los procesos térmicos a fin de inhibir las reacciones de condensación y polimerización que conducen a la producción de coque y de esta manera lograr recuperar un porcentaje mayor de la fracción de crudos no destilable en productos de mayor calidad y valor (Pereira y col., 1999).

### ***Tecnología HDHPlus®***

HDHPlus® (Hidroconversión, Destilación al Vacío e Hidrotratamiento), es un proceso de hidroconversión profunda de residuales capaz de producir crudos sintéticos livianos (> 40 °API). En la actualidad es la tecnología más atractiva económicamente en el ámbito mundial, debido a que compite con todas las tecnologías de punta relacionadas con el mejoramiento de crudos pesados y extrapesados. Fue desarrollada por PDVSA-Intevep y, aunque no ha sido puesta en marcha, está lista para su aplicación comercial (Morales, 2005).

La tecnología consiste en un proceso de alta conversión (85/93 %) de crudos pesados y residuos de refinería vía hidroconversión, del mismo modo se alcanza una conversión de asfaltenos entre el 80-85 %. Tiene lugar en reactores trifásicos del tipo columna de burbujeo de flujo ascendente (fig. 12), produce un elevado rendimiento en líquidos (115 %) de alta calidad y valor comercial (nafta, destilados medios y fuel

oil) y es muy flexible para procesar diferentes cargas con alto contenido de azufre y metales. Posee condiciones de operación severas: 180-200 bar de presión total, 125-150 bar de presión parcial de hidrógeno y 440-470 °C de temperatura. Por otro lado, minimiza notablemente el manejo de sólidos y subproductos en la refinería, además es totalmente amigable con el ambiente (PDVSA, Plan 2006-2012).

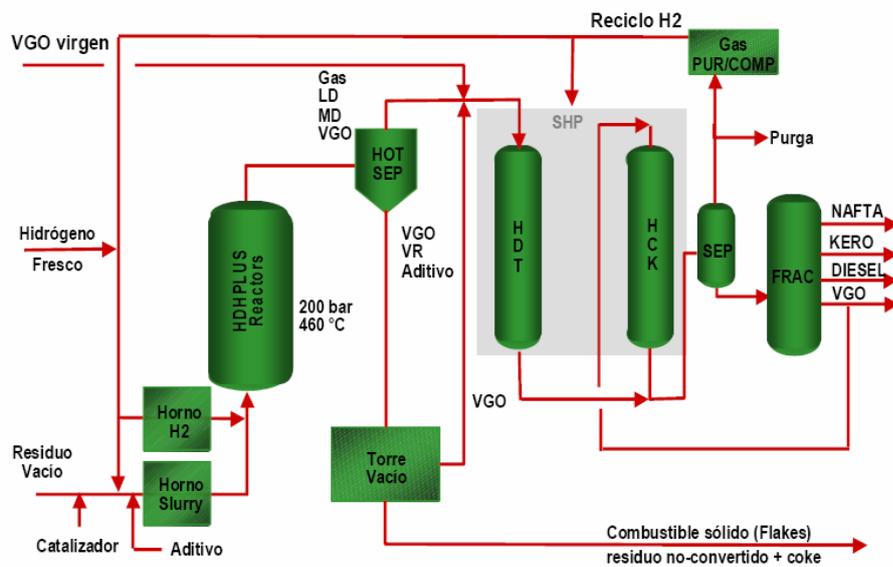
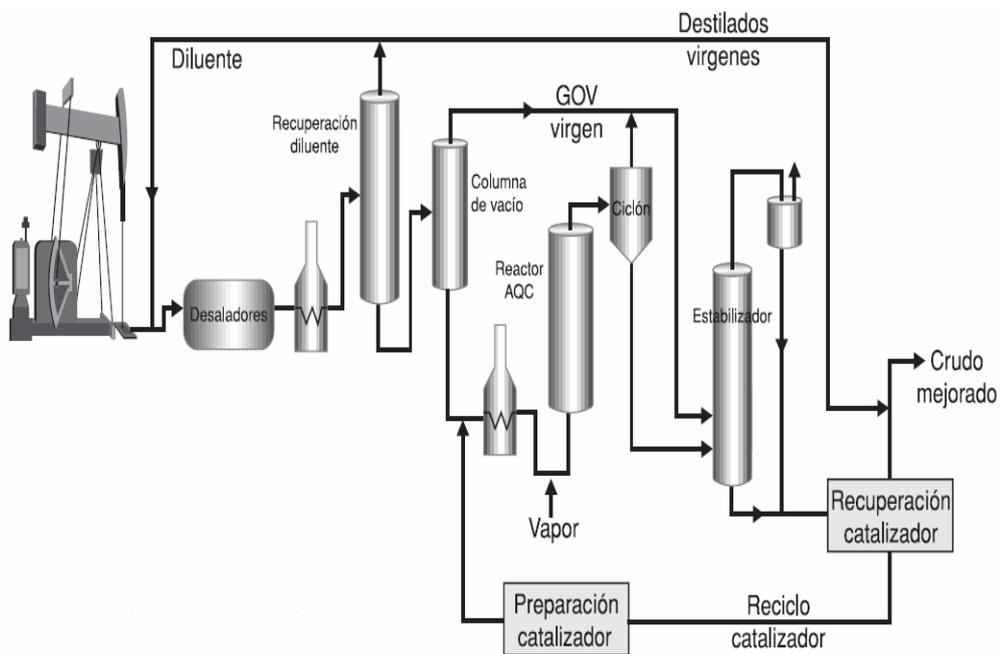


Figura 12. Diagrama de proceso simplificado HDHPlus®/SHP (PDVSA, Plan 2006-2012)

### Tecnología Aquaconversion®

Aquaconversion®, es un proceso catalítico novedoso del área de refinación, que consiste en una alternativa para la conversión de residuales y mejoramiento de crudos pesados, para la producción de crudos sintéticos mejorados (> 13 °API). Actualmente se emplea en la primera etapa de mejoramiento de los crudos de la faja, aumentando su gravedad API hasta 16 °API. El proceso utiliza vapor de agua, catalizadores dispersos, temperaturas moderadas y bajas presiones. El agua se emplea como fuente hidrógeno y los hidrocarburos pesados se craquean e hidrogenan ligeramente por la vía del vapo-reformado catalítico. Es importante señalar que en dichas condiciones de

temperatura y presión en las cuales se desarrollan las reacciones de Aquaconversion® coexisten las reacciones de craqueo térmico de hidrocarburos. Este proceso por tanto aprovecha la formación térmica de esos radicales para desviar parcialmente el craqueo térmico hacia la obtención de una mayor cantidad de compuestos de menor peso molecular e inhibir las reacciones de condensación y polimerización que conducen a la producción de coque, mediante la producción de radicales hidrógeno provenientes de la disociación del agua (fig. 13) (Pereira y col., 1999).



**Figura 13:** Esquema Aquaconversion® a boca de pozo (Pereira y col., 1999)

Es importante destacar que estos métodos convencionales utilizados actualmente para reducir la viscosidad y mejorar crudos pesados (craqueo térmico, craqueo catalítico, etc.) implican grandes costos, tienen una alta complejidad operacional, son poco selectivos y altamente contaminantes (a excepción del proceso HDHPlus®). Por tal motivo, estos factores estimulan el desarrollo de procesos biotecnológicos que logren la transformación del CXP en crudo comerciable y de fácil refinación, reduciendo así

la contaminación, los costos y el consumo de energía durante el proceso, permitiendo además la obtención de productos de mejor calidad para satisfacer la demanda energética de la población mundial.

A continuación se describe en forma detallada las características de este tipo de proceso así como de los microorganismos involucrados en su funcionamiento.

### **Estrategia de Biomejoramiento de Crudos Extrapesados**

Existe un gran número de microorganismos heterotróficos capaces de utilizar los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía. Estos microorganismos presentan una especificidad biomejoradora hacia los diferentes componentes del petróleo. Los hidrocarburos saturados son los más propensos a la oxidación seguidos de los hidrocarburos aromáticos. Las resinas y asfaltenos se consideran como compuestos resistentes a la bioconversión, esto se debe a su estructura compleja que implica la intervención de diferentes tipos de enzimas que sean capaces de oxidar tanto alcanos lineales como cíclicos, hidrocarburos aromáticos, poliaromáticos y heteropoliaromáticos (Pineda y col., 2002).

El objetivo del mejoramiento biológico es realizar un conjunto de transformaciones que hagan más fácil la producción y el transporte del crudo, así como también originar los cambios químicos que incrementen el valor del mismo (León y Kumar, 2005). Entre las diferentes reacciones que pueden cambiar las propiedades físicas del crudo pesado y mejorar su viscosidad tenemos:

- (a) Rompimiento de los enlaces internos de las moléculas de asfaltenos para disminuir el peso molecular promedio.
- (b) Oxidación de los anillos aromáticos de las grandes moléculas, para modificar las interacciones con otras moléculas e induciendo a su vez un rearrreglo de agregados para liberar las moléculas más pequeñas atrapadas.

- (c) Formar quelatos metálicos con los metales presentes en agregados de asfaltenos.
- (d) Romper las moléculas originales de resinas o aromáticos, ocasionando la disminución del peso molecular promedio.
- (e) Romper las grandes cadenas alifáticas.

La conversión biológica de crudos pesados puede tener impacto en cuatro propiedades importantes: i) reducción de la viscosidad, ii) mejoramiento de la composición, iii) control de la deposición de ceras y asfaltenos y iv) eliminación de los ácidos nafténicos (Leon y Kumar, 2005). Siendo las dos primeras, de vital interés en este trabajo de investigación.

### ***Reducción de la Viscosidad***

Generalmente los crudos pesados son diluidos con hidrocarburos livianos, para reducir la viscosidad, facilitando su transporte a través de los oleoductos y su procesamiento. Se espera en los próximos años que la producción de crudos pesados aumente y exceda la disponibilidad del diluyente, de manera que será necesario un tratamiento alternativo. La viscosidad de un crudo pesado es el resultado de interacciones entre las moléculas más pesadas, los asfaltenos. Estas interacciones incluyen el enredo o enmarañamiento de las cadenas de los alcanos, y del mismo modo, interacciones más ordenadas entre los conjuntos aromáticos que conducen a la formación de estructuras por todo el crudo (Kirkwood y col., 2004).

La ruptura de los asfaltenos a moléculas más pequeñas, reduciría las interacciones moleculares conduciendo a una reducción de la viscosidad. El clivaje microbiano de los sulfuros alifáticos, identificados como estructuras de enlace comunes en los puentes alifáticos contenidos en los asfaltenos, producen dos fracciones de asfaltenos, reduciendo a la mitad el peso molecular de la fracción más pesada, y logrando de este modo, una reducción de la viscosidad y el peso molecular del crudo tratado (Kirkwood y col., 2004).

Hay evidencia en la literatura de diferentes géneros bacterianos aeróbicos y anaeróbicos (Pineda y col., 2004), cultivos mixtos bacterianos (Ferrari, Albornoz y Neirotti, 1994), microorganismos extremofílicos (Premuzic, Lin y Manowitz, 1994) y diversas enzimas (Fedorak y col. 1993), que son capaces de despolimerizar las moléculas de asfaltenos, liberando moléculas más pequeñas, con lo cual se logra una reducción significativa en el contenido de asfaltenos y por tanto una reducción de la viscosidad (León y Kumar, 2005).

### ***Mejoramiento de la Composición***

Muchos de los procedimientos de degradación cuyos objetivos son mejorar la composición de los crudos tradicionales, son también aplicables a los crudos pesados (Kirkwood y col., 2004), entre ellos tenemos: i) la eliminación de heteroátomos azufre (S) y nitrógeno (N), ii) eliminación de metales vanadio (V) y níquel (Ni), iii) rompimiento de anillos aromáticos; y iv) reducción del peso molecular (León y Kumar, 2005).

#### ***➤ Eliminación de heteroátomos azufre (S) y nitrógeno (N)***

Los heteroátomos y metales presentes en los crudos son problemáticos en las operaciones de refinación. Las remociones de S y N son también necesarias para cumplir con las regulaciones gubernamentales sobre las emisiones de estos elementos, cuando se queman los combustibles refinados. La eliminación selectiva de estos contaminantes manteniendo el contenido energético del crudo, resulta difícil por medio de técnicas convencionales, por tal razón, la aplicación de procesos biológicos que permitan eliminar de forma específica estos elementos, ofrece una solución alternativa a estos problemas (León y Kumar, 2005).

Se han encontrado varios microorganismos que actúan como biocatalizadores en la eliminación exclusiva del azufre contenido en compuestos heterocíclicos, los cuales

se caracterizan por ser resistentes a la desulfuración química convencional (hidrodesulfuración), tal es el caso, de la desulfuración selectiva de los dibenzotiofenos alquilados (DBT's), un representante típico de los compuestos orgánicos de azufre en el petróleo. La biodesulfuración de ese compuesto se lleva a cabo en condiciones de reacción menos severas, formándose el compuesto 2-hidroxidifenil. En el caso de los crudos pesados de alto contenido de azufre, los procesos convencionales de mejoramiento resultan menos económicos, debido a los altos costos de los catalizadores. Los microorganismos que utilizan el azufre como única fuente de energía en lugar de carbono, son prometedores en la biodesulfuración del petróleo pesado, ya que resultan más económicos al requerir menos energía para realizar esa transformación (Monticello, 2000; y Gray, Mrachko y Squires, 2003).

Al igual que el azufre, el nitrógeno en el crudo se encuentra en compuestos heterocíclicos, tales como quinolinas y carbazoles (compuestos organonitrogenados). Se ha reportado en la literatura, que la mayoría, de los cultivos microbianos estudiados que metabolizan la molécula de quinolina, la degradan completamente, porque utilizan este compuesto como fuente de carbón y nitrógeno disminuyendo su poder calorífico (Van Hamme, Singh y Ward, 2003). En el caso del carbazol, han sido reportadas una bacteria (Bressler y col., 2000) y una enzima (Xu y col., 1998), capaces de eliminar exclusivamente el nitrógeno, dejando casi intacto el contenido de carbono y por tanto el valor energético del combustible.

De este modo, para utilizar cultivos microbianos en el mejoramiento del crudo pesado, es preferible que el nitrógeno fuese removido selectivamente de estos compuestos, sin embargo, muy pocos microorganismos poseen esta capacidad de eliminar selectivamente el nitrógeno de los compuestos heterocíclicos sin degradar el esqueleto carbonado de la molécula (León y Kumar, 2005).

➤ *Eliminación de metales vanadio (V) y níquel (Ni)*

Los elementos metálicos en el crudo conducen principalmente a dos problemas en la industria. En primer lugar, la combustión de fracciones pesadas de crudo con alto contenido en metales origina la formación de desechos indeseables, tal como, cenizas con alto contenido de óxidos metálicos tóxicos. En segundo lugar, una vez que el crudo se refina, la fracción no destilable o residuo (el cual posee una alta concentración de metales), a menudo se somete a procesos de coquificación retardada produciendo coque con elevados contenidos de metales (León y Kumar, 2005).

Los metales en el petróleo se encuentran en: forma de sales, en petroporfirinas y formando complejos metálicos ocluidos en las grandes estructuras asfálticas, de donde resulta muy problemática su remoción. Los compuestos organometálicos encontrados en las fracciones de resina y asfaltenos en el crudo, contienen predominantemente vanadio y níquel (León, 2001).

Se han reportado en la literatura varias enzimas capaces de eliminar metales de petroporfirinas contenidas en asfaltenos, sin embargo, sólo las enzimas generadas por un cierto tipo de bacteria (*Bacillus megaterium* y *Catharantus roseus*), poseen la ventaja de liberar metales por oxidación de los anillos porfirínicos en lugar de la cloración (sistema empleado por otras enzimas), evitando la formación de productos clorados dañinos al medio ambiente (Vázquez-Duhalt y col. 2002).

➤ *Ruptura de anillos aromáticos*

La presencia de hidrocarburos aromáticos tiene efectos adversos en la producción y procesamiento del petróleo, el empleo de combustibles ricos en hidrocarburos aromáticos contribuye a la formación de hollín y a combustiones pobres (por ejemplo en motores diesel). Los métodos de craqueo de estos compuestos utilizados en la

degradación convencional resultan muy costosos, ya que requieren altas temperaturas, altas presiones e hidrogenación catalítica (Kirkwood y col., 2004).

Exxon Research and Engineering Company, han patentado un proceso denominado biodearomatization (*biodesaromatización*), cuya primera etapa consiste en la hidroxilación de los anillos aromáticos del petróleo por medio de microorganismos y otros biocatalizadores. La hidroxilación de los anillos aromáticos los activa y en la segunda etapa, son transformados en cicloalquilaromáticos por hidrogenación química e hidrogenólisis en fase acuosa. Los microorganismos empleados en esta patente fueron bacterias del lago de asfalto de Guanoco (Edo. Sucre-Venezuela), las cuales tienen capacidad de emplear hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) como única fuente de carbono y energía, además tienen la capacidad de crecer en bitumen y crudos pesados reduciendo el contenido de asfaltenos, resinas, azufre y nitrógeno, originando una disminución de la viscosidad (Coyle y col., 2000).

➤ *Reducción del peso molecular*

La reducción del peso molecular es necesaria para convertir la fracción residuo de los crudos pesados (525 °C+) a destilados de menor punto de ebullición (< 525 °C) y también para mejorar la composición fraccional y el valor comercial de los crudos pesados (León y Kumar, 2005). El craqueo de los enlaces alifáticos C-S contribuye a la reducción del peso molecular, pero para alcanzar la reducción completa requerida, es necesario el craqueo de los enlaces C-C encontrados en los puentes alquílicos, sin embargo, en la degradación primaria de los crudos pesados, el uso del craqueo catalítico es limitado, debido al excesivo envenenamiento y desactivación de los catalizadores (Kirkwood y col., 2004).

Químicamente, los alcanos son los hidrocarburos menos reactivos, sin embargo la biodegradación bacteriana aeróbica de estos compuestos ha sido reportada para longitudes de cadena desde C<sub>1</sub> (metano) hasta C<sub>36</sub> (hexatriacontano). Los alcanos

isoprenoides ramificados tales como pristano (2,6,10,14- tetrametilpentadecano) también son biodegradables (Kirkwood y col., 2004).

La reducción del peso molecular en la fracción residuo de crudos pesados requiere la ruptura de puentes alquílicos, donde ambos terminales de la cadena carbonada están bloqueados por unión a grupos aromáticos. Las rutas más comunes de conversión bacteriana aeróbica y anaeróbica de alcanos no son adecuadas para la reducción del peso molecular en crudos, debido a que la actividad bacteriana sólo activa el terminal libre de la molécula. Investigaciones sobre n-alcanos de cadena larga y cicloalcanos, demuestran que una cadena alquílica puede romperse por medio de un ataque bacterial en ausencia de un grupo metilo terminal. Esta reacción es análoga a la ruptura de los puentes alquílicos encontrados en los componentes de alto peso molecular de los crudos (Kirkwood y col., 2004).

Una vez conocido el sistema biológico que desarrollan los microorganismos en la degradación de los compuestos orgánicos, tal como los hidrocarburos, resulta necesario conocer algunas técnicas de análisis de las propiedades de los crudos pesados con el fin de determinar los cambios que se producen en sus propiedades físico-químicas una vez finalizado el tratamiento biológico. A continuación se presenta una descripción detallada de los análisis empleados en la caracterización del crudo extrapesado y de los residuos no destilables en la refinería.

### **Evaluación del Mejoramiento sobre las Propiedades del Crudo Extrapesoado**

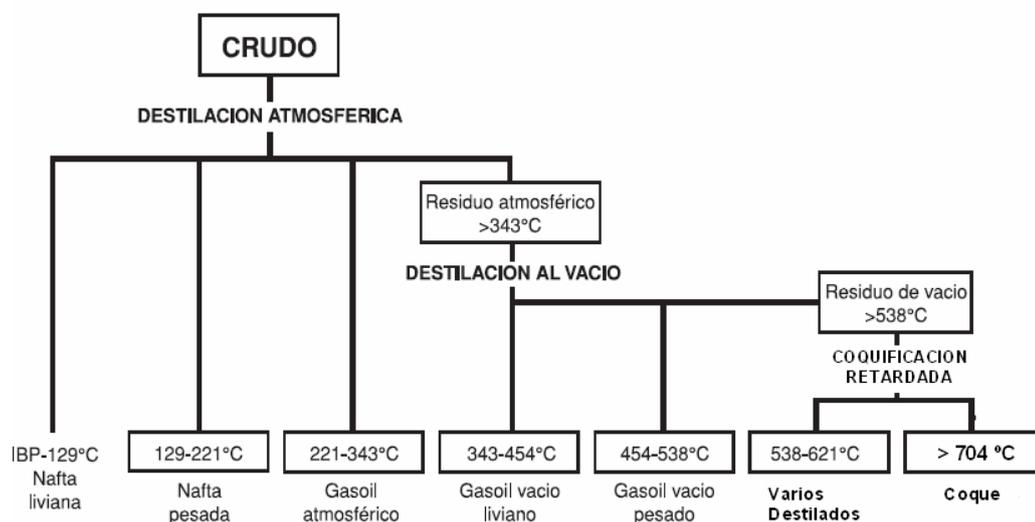
El conocimiento integral de los crudos no sólo permite su clasificación y valorización para efectos de comercialización sino una mejor planificación de sus usos posteriores. La caracterización de crudos es un proceso dinámico que permite obtener informaciones químicas detalladas del crudo y de sus fracciones representativas tanto químicas como físicas, sin emplear procedimientos normalizados sino más bien

desarrollados para propósitos específicos de la caracterización (Carbognani y col., 1999).

Cualquier esquema de evaluación o caracterización de crudos a escala industrial, normalmente se inicia con la destilación de subfracciones, que permite establecer los rendimientos de los distintos cortes de valor comercial. Por tal razón, se describirá brevemente el principal proceso de la industria de la refinación denominado destilación fraccionada (Gary, 1980).

**Destilación Fraccionada de Crudos**

Algunos procesos típicos en una refinería son: destilación de crudos, desintegración catalítica, reformación de naftas, reducción de viscosidad de residuales, alquilación, hidrotratamiento (Gary, 1980). La figura 14 muestra un esquema típico de destilación en el cual se ha incluido la coquificación del residuo de vacío.



**Figura 14.** Esquema general de destilación de crudos (Carbognani y col., 1999)

El proceso comienza cuando el petróleo crudo se calienta en un horno cerca de 400 °C, a continuación se bombea hacia la base de una columna de destilación, que suele medir más de 30 m, en la cual se colocan platos de recolección a diferentes alturas. Conforme el petróleo crudo caliente entra a la columna de destilación, las moléculas con puntos de ebullición bajos se separan del líquido y se elevan hacia las partes más frías de la columna, los hidrocarburos incondensables, permanecen como gases, subiendo hasta la parte superior de la columna, de dónde son extraídos como la fracción gaseosa del petróleo (Carbognani y col., 1999).

Algunas sustancias se condensan nuevamente y caen en los platos situados a diferentes alturas de la columna, estas sustancias se extraen como fracciones líquidas, cada una con un intervalo de ebullición diferente; las sustancias que tienen los puntos de ebullición más altos nunca se convierten en gases; permanecen en estado líquido durante todo el proceso de destilación, estos líquidos espesos (viscosos), llamados residuos, escurren de la base de la columna (Gary, 1980). Los productos de cada uno de los cortes de destilación se especifican en la tabla N° 3.

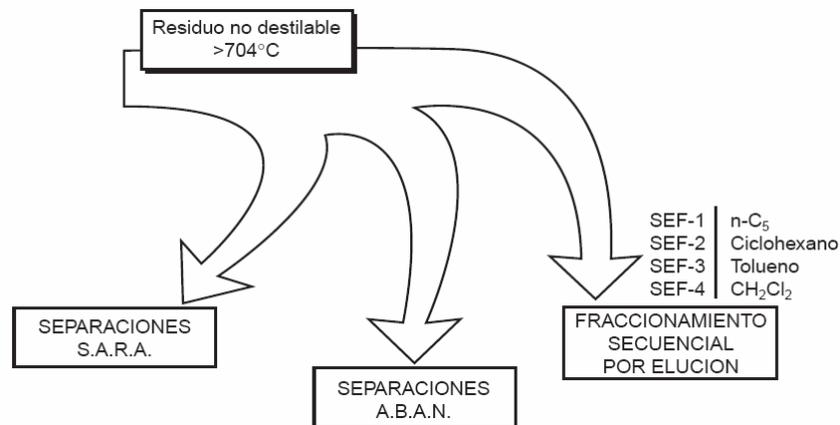
**Tabla N° 3.** Fracciones de cada uno de los cortes de destilación (Gary, 1980).

Fracción	Intervalo de tamaño de las moléculas	Intervalo de puntos de ebullición	Usos
Gas	C1 - C4	0 a 30 °C	Gas combustible
Gasolina de proceso directo	C5 - C12	30 a 200°C	Combustible para automóviles
Queroseno	C12 - C16	180 a 300°C	Combustible para aviones a reacción y motores diesel
Gasóleo	C16 - C18	más de 300°C	Combustible para motores diesel, materia prima para pirólisis
Materia prima para lubricantes	C18 - C20	más de 350°C	Aceite lubricante, materia prima para pirólisis
Cera parafínica	C20 - C40	Sólidos de bajo punto de fusión	Velas, papel encerado
Asfalto	más de C40	Residuos pegajosos	Asfalto para carretera, alquitrán para techos

Debido a la gran demanda de combustible a nivel mundial, es importante señalar, que la mayor parte de un barril de petróleo crudo en la refinería se convierte en combustibles, mas del 40 % en gasolina, de 30 a 35 % en combustóleo o gasóleo para motores diesel, calefacción y otros fines; y de 7 a 10 % en queroseno (combustible para motores de tractor y reactores); gran parte de lo que resta se vende como gasolina de aviación, gas licuado de petróleo, aceites lubricantes, grasas y asfalto.

Comparados con los crudos convencionales, los CXP no solo son más difíciles de producir sino que plantean diversos desafíos en el análisis de fluidos de laboratorio, debido a que las técnicas tradicionales de análisis de las propiedades de crudos convencionales no logran caracterizar en forma completa las muestras de crudo pesado (Alboudwarej y col., 2006).

Un aspecto que complica la caracterización de los cortes de destilación, reside en la existencia de fuerzas de atracción intermolecular variables (fuerzas de Van der Waals: interacciones de carga tipo dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno), entre las diversas familias de compuestos que integran el petróleo (Carbognani y col., 1999). Este tipo de complicación en la destilación física da base para someter los cortes obtenidos, especialmente el corte de moléculas más pesadas (residuo no destilable), a otros esquemas de separaciones químicas, tales como: análisis *SARA* (hidrocarburos Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfaltenos), método *SEF* (Solvent Eluted Fractionation) y el método *ABAN* (Hidrocarburos Ácidos, Básicos, Anfotéricos y Neutros), tal como se puede observar en la figura 15.



**Figura 15:** Alternativas viables para el residuo no destilable de crudos pesados (Carbognani y col., 1999).

La complejidad molecular de las fracciones de destilación más pesadas, así como la marcada complejidad de los residuales del petróleo, ha constituido un motivo para efectuar su separación en subfracciones fisicoquímicamente representativas (Carbognani y col., 1999). A continuación se describe en forma breve uno de estos métodos de separación conocido como análisis SARA.

### ***Análisis SARA. El fraccionamiento Cromatográfico del Crudo Pesado y sus Residuos***

La forma más común de lograr fracciones representativas es mediante la separación del petróleo en grupos de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (expresados como porcentaje en peso), conocida mediante sus iniciales como análisis *SARA*. Su principio fundamental es la separación basada en fenómenos físicos de adsorción.

La muestra se separa inicialmente en dos fracciones: la fracción insoluble en n-heptano que corresponde a los asfaltenos y la fracción soluble denominada maltenos. Los maltenos o parte soluble en n-heptano son absorbidos sobre alúmina GC (grado

cromatográfico) activada y luego son fraccionados en saturados, aromáticos y resinas por elusión en solvente en una columna cromatográfica de vidrio. Las fracciones eluidas son recuperadas por eliminación del solvente antes de ser pesadas y la fracción insoluble es separada del n-heptano por filtración y pesada posteriormente (ASTM-D-4124-01, 2001).

Por otra parte, si bien el análisis SARA resuelve sólo cuatro componentes y parece de baja resolución si se compara con los miles de componentes que pueden resolverse con la técnica de cromatografía de gases, la fortaleza del método radica en que analiza la muestra entera, desde los compuestos livianos hasta los pesados, y de este modo permite comparar todos los petróleos en base a un estándar consistente. Sin embargo, las prácticas de este análisis pueden variar, dificultando la comparación de las mediciones obtenidas en diferentes laboratorios (Alboudwarej y col., 2006).

### ***Viscosidad y Densidad Relativa (Gravedad API) de un Crudo***

Como se mencionó anteriormente, la densidad (gravedad API) y la viscosidad son dos parámetros de vital importancia en la industria petrolera para determinar la calidad de los crudos. Si bien la gravedad API del petróleo es un mejor indicador para evaluar el valor del recurso y estimar el rendimiento de los derivados de la destilación y los costos de refinación, la viscosidad es la propiedad que más afecta la producción del crudo (Alboudwarej y col., 2006). Por otra parte, la viscosidad puede variar en gran medida con la temperatura. La gravedad API varía poco con la temperatura, y se ha convertido en el parámetro “estándar” del campo petrolero comúnmente utilizado para categorizar los petróleos crudos (Curtis y col., 2002).

### ***Destilación Simulada***

La destilación simulada es una técnica de cromatografía de gases (GC) que identifica los componentes de los hidrocarburos en el orden de sus puntos de ebullición. El

cromatógrafo de destilación simulada usa una válvula de inyección de micro volumen y columnas tubulares de sílice fundida a fin de separar la muestra compuesta por una mezcla compleja de hidrocarburos en diversas fracciones. En los petróleos pesados la destilación simulada tiene una aplicación limitada, ya que los componentes más grandes que conforman una fracción significativa del petróleo pesado experimentan degradación química a temperaturas elevadas; el craqueo comienza a ocurrir por encima de 350 °C (Alboudwarej y col., 2006).

### **Los Hongos y sus Características**

Los hongos son organismos eucariotas, heterotróficos específicamente quimioorganotróficos, es decir, requieren de materia orgánica preformada como fuente de energía, nitrógeno y carbono. Estos pueden desarrollarse en estructuras unicelulares o multicelulares y se reproducen generalmente por medio de esporas. La ausencia de pigmentos fotosintéticos los obliga a desarrollarse como saprofitos o bien como parásitos. Obtienen los nutrientes por absorción, ya que estos, para poder entrar a su cuerpo deben pasar a través de la pared celular y la membrana plasmática (Bartra, 2005).

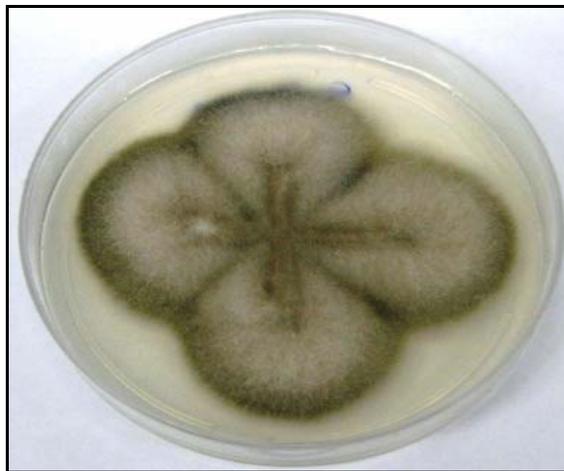
En lugar de ingerir primero los alimentos y luego digerirlos como lo hacen los animales, la mayoría de los hongos liberan enzimas digestivas hacia el ambiente externo. Estas enzimas rompen moléculas relativamente insolubles y complejas tales como: carbohidratos, proteínas y lípidos a moléculas más pequeñas y más solubles que pueden ser más fácilmente absorbidas. Para garantizar la difusión de nutrientes solubles de regreso a la célula, es necesario un medio húmedo (Alexopoulos, 1996).

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfología: una multicelular llamada filamentosa, y otra unicelular llamada levaduriforme (Bartra, 2005). El crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una spora o de una fracción viable de hifa. Las *hifas* o filamentos son estructuras cilíndricas, formadas por múltiples células que constituyen el cuerpo (o soma) del hongo (fig. 16).



**Figura 16.** Hifas constituyentes del micelio de un hongo filamentoso (Bartra, 2005).

Las hifas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen formando un entramado de filamentos que se llaman micelio (Bartra, 2005) (fig. 17).



**Figura 17:** Aspecto del hongo filamentoso *Pseudallescheria* sp.

Las hifas pueden ser de dos tipos: hifas vegetativas, las cuales penetran el sustrato para obtener los nutrientes, e hifas aéreas, las cuales son las portadoras de las estructuras reproductoras (Bartra, 2005). Las estructuras reproductoras a diferencia de

las estructuras somáticas exhiben una variedad de formas, siendo esta la base por medio de la cual se clasifican los hongos mitosporíticos filamentosos (Alexopoulos, 1996).

### ***Clasificación Taxonómica de los Hongos***

A lo largo de los años, se han realizado diferentes clasificaciones. Actualmente los hongos se dividen en cuatro subgrupos principales, de acuerdo a su tipo de reproducción: *Chytridiomycota*, *Zigomycota*, *Ascomycota* y los *Basidiomycota*. Estos grupos corresponden a taxas naturales, es decir, que los organismos que pertenecen a ellos provienen de un ancestro común (grupo monofilético) (Alexopoulos, 1996).

En este trabajo de investigación se estudiarán hongos mitospóricos, llamados también anamorfos o estudios imperfectos pertenecientes al *Phylum Ascomycota*. Estos hongos pueden crecer como levaduras o bien como hongos filamentosos. En los hongos filamentosos, las hifas presentan septos dispuestos regularmente. Se pueden reproducir asexualmente formando conidios, aunque algunas especies también pueden recurrir a la reproducción sexual, dando origen a esporas sexuales denominadas ascosporas, contenidas en un saco llamado asco (Alexopoulos, 1996).

### ***Factores que Afectan el Crecimiento de los Hongos***

La esporulación (formación de esporas) y el crecimiento vegetativo de las hifas están sometidos a condiciones ambientales, geográficas y nutricionales determinadas. Algunas condiciones externas influyen favorable o desfavorablemente en el crecimiento de los hongos, entre estos factores tenemos: la temperatura, el pH, la humedad, el oxígeno y nutrientes, entre otros (Bartra, 2005):

*(a) Temperatura*

La temperatura afecta el metabolismo de las células. Influye tanto en la capacidad enzimática del organismo, como en la fluidez de los lípidos en la membrana celular. La sensibilidad a la temperatura varía entre cepas, así cada hongo tiene una temperatura óptima tanto para el crecimiento como para la fructificación (Sánchez, 2000). Existen tres márgenes de temperatura: mínimo, óptimo y máximo. La temperatura óptima para la mayoría de las especies está entre 25 y 30 °C, con límites inferior y superior de aproximadamente 10 y 40 °C. Sin embargo, ciertas formas termofílicas tienen una temperatura óptima por encima de 40 °C, y algunas pueden crecer a temperaturas superiores a 50 °C (Alexopoulos, 1996).

*(b) pH*

El pH del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, porque incide sobre el carácter iónico del medio e influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular, afectando directamente su metabolismo (Sánchez, 2000). El pH óptimo que favorece el crecimiento de diferentes tipos de hongos varía ampliamente. Los hongos crecen, generalmente, en un intervalo de pH de 4 a 7 (Alexopoulos, 1996).

*(c) Oxigenación*

La mayoría de los hongos son aeróbicos estrictos. Si el medio es rico en nutrientes los hongos pueden crecer con una baja concentración de O<sub>2</sub>, pero su producción celular será menor del 10 % de la que se conseguiría en condiciones aeróbicas óptimas (Bartra, 2005).

*(d) Humedad*

El contenido de humedad influye directamente sobre el desarrollo de los hongos porque afecta la disponibilidad de los nutrientes (Sánchez, 2000). Para obtener

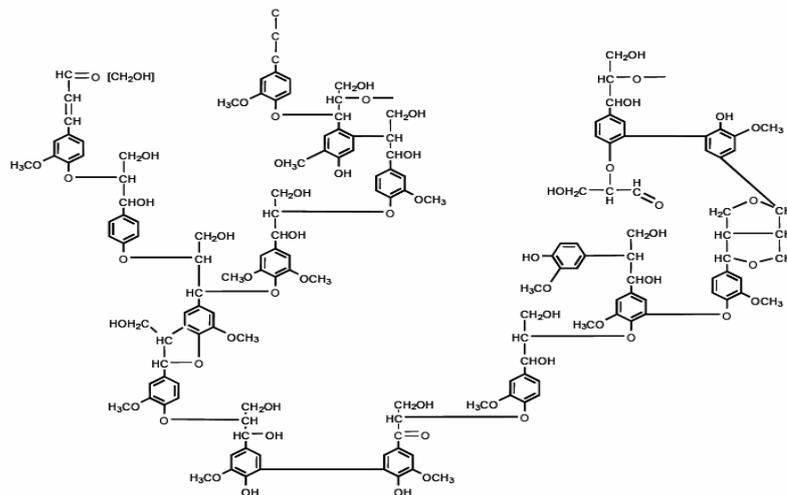
nutrientes los hongos tienen que excretar enzimas que degradan los polímeros en monómeros, y la difusión de estas enzimas se lleva a cabo en un medio húmedo.

(e) *Nutrientes:*

En general los hongos aprovechan cualquier resto orgánico para obtener los nutrientes. Los carbohidratos de origen vegetal constituyen la fuente de energía más abundante para los hongos, en la naturaleza. El polímero más importante disponible para los hongos, en una amplia gama de ambientes es la celulosa. Como fuente de nitrógeno puede utilizar los nitratos, las aminas o las sales de amonio (Bartra, 2005).

***Lignina: Estructura y Biodegradación***

La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera. Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo y altamente ramificado (fig. 18). Este biopolímero rodea y protege a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa y hemicelulosa) del ataque de organismos patógenos (Kirk y Farrell, 1987; Lin y Dence, 1992).



**Figura 18.** Estructura química representativa de la lignina (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006)

Una molécula de lignina posee un peso molecular en el rango de 600-1000 kDa, resulta evidente que su tamaño le impide ser degradada intracelularmente, además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradada por mecanismos típicos de hidrólisis (Fengel y Wegener, 1989).

### ***Hongos Ligninolíticos***

Las características estructurales de la lignina la hacen muy recalcitrante y generalmente sólo puede ser mineralizada (transformada hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) por un grupo de hongos ligninolíticos denominados “hongos de la pudrición blanca de la madera”. Estos organismos han desarrollado un sistema único y no específico que funciona en el ambiente extracelular (Kirk y Farrell, 1987). El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres y permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos, tales como: bifenilos policlorinados, explosivos aromáticos, HPAs y plaguicidas (clorados y organofosforados) (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Como la mayoría de los hongos excretan enzimas para transformar polímeros complejos y poder obtener su alimento, a continuación se describe la función y las características de estos catalizadores biológicos.

### ***Sistema Enzimático de Degradación de Lignina (SEDL) de Hongos Ligninolíticos***

A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Varios años después se descubrió una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Shimada y Higuchi, 1983; Tien y Kirk, 1983). Se calcularon pesos moleculares de entre 41-42 kDa y se

encontró que contenía un grupo prostético hemo. Estudios espectroscópicos mostraron que esta ligninasa era distinta de las oxigenasas, compartía algunas características con las hemoproteínas y transportadoras de oxígeno y que era en realidad una peroxidasa, conocida actualmente como lignina peroxidasa (LiPp). Las LiPp están glicosiladas y tienen pH óptimos ácidos (KirK y Farrell, 1987). A partir de este hallazgo, se encontró la producción de otras hemoperoxidasas: la manganeso peroxidasa (MnPp) que oxida el  $Mn^{2+}$  a la especie oxidante  $Mn^{3+}$  y más recientemente se ha descrito otra enzima, la peroxidasa versátil (PV) que conjuga las propiedades catalíticas de LiPp y MnPp (Mester y Field, 1998).

Además de estas peroxidasas, se detectó la producción en estos hongos ligninolíticos de una cuarta enzima, una fenol oxidasa, denominada lacasa (LACp). Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua, y a través de la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina y aminas aromáticas. Todas las LACp son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa. (Bourbonnais y Paice, 1990). Bioquímicamente, la LACp es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos. Cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromático, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. El empleo de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisorio para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales, entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel, la decoloración de colorantes textiles y la oxidación de HPAs (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Los HPAs son componentes del petróleo y ampliamente distribuidos en el ambiente. Los compuestos como el pireno, bezo(a)pireno, acenafteno, fenantreno, antraceno y fluoranteno pueden ser oxidados por enzimas como la LiPp, la MnPp, la VPP y la LACp (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006). El hecho de que se obtengan los mismos productos de oxidación sugiere que las enzimas tienen el mismo mecanismo de oxidación (Vázquez-Duhalt, 1998). Finalmente, todas estas enzimas ligninolíticas

pueden actuar de forma separada o en cooperación, dependiendo de cuantas enzimas pueda producir el hongo (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

### ***Enzimas: catalizadores biológicos***

Las reacciones químicas en sistemas biológicos raramente ocurren en ausencia de un catalizador, estos catalizadores se denominan *enzimas*. Las enzimas son, con la excepción de las ribozimas, proteínas globulares capaces de catalizar las reacciones metabólicas. Las células las sintetizan para acelerar las reacciones químicas y controlar procesos biológicos. Normalmente son solubles en agua, pueden actuar a nivel intracelular, es decir, en el interior de la célula donde se han formado, o a nivel extracelular, en la zona donde se segregan. Las enzimas poseen las siguientes propiedades: i) son termolábiles y su actividad depende del pH del medio; ii) poseen una estructura orgánica altamente compleja; y iii) generalmente el reconocimiento de la enzima con el reactivo a procesar (sustrato) es altamente específico (Sánchez, 2002):

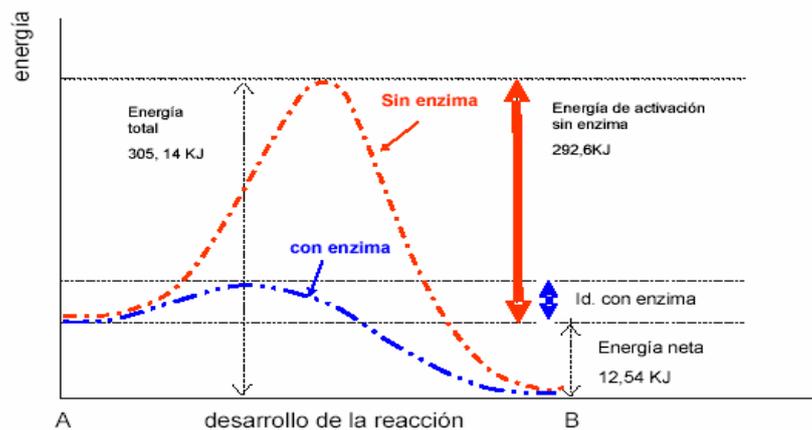
Una enzima puede actuar sobre un sustrato o un grupo de sustratos relacionados (especificidad de sustrato). Otras enzimas, sin embargo, tienen especificidad de acción al realizar una acción determinada pero sobre múltiples sustratos (Sánchez, 2000). Como todos los catalizadores las enzimas aceleran notablemente la velocidad de una reacción química y cumplen con las siguientes características (Sánchez, 2002):

- (a) Son efectivas en pequeñas cantidades, ya que actúan con gran rapidez y se recuperan intactas para poder actuar de nuevo.
- (b) No sufren modificaciones químicas irreversibles durante la catálisis. Es decir, la estructura de las enzimas que catalizan la reacción, es indistinguible de las que no lo han hecho.
- (c) El estado inicial y final de la reacción es el mismo, lo que favorecen es que se obtenga la misma cantidad de producto en menos tiempo.

La producción de enzimas por microorganismos, tales como, bacterias y hongos, tiene la ventaja de poseer un costo generalmente bajo, actúan a temperatura ambiente y se desarrollan en un período relativamente breve, de 1 a 5 días. Las enzimas elaboradas industrialmente son por lo general del tipo degradativo y extracelular, es decir, son excretadas al medio por el microorganismo que las genera y de este modo no es necesaria la ruptura de las células microbianas para su extracción (Bohinski, 1987).

### *Actividad de las Enzimas*

En toda reacción química se produce una transformación de unas sustancias iniciales, denominadas reactivos o sustratos (S), en unas sustancias finales o productos (P). Esta transformación no se lleva a cabo directamente, ya que es necesario un paso intermedio en el cual los reactivos se activan, de forma que sus enlaces se debiliten y se favorezca su ruptura. Este paso intermedio recibe el nombre de complejo activado y requiere un aporte de energía, generalmente en forma de calor que recibe el nombre de energía de activación (fig. 19).



**Figura 19.** Energía de activación necesaria para que A se transforme en B, con y sin biocatalizador (Sánchez, 2002).

Las enzimas pueden actuar de dos formas: i) fijándose mediante enlaces fuertes (covalentes) al sustrato, de modo que se debiliten sus enlaces minimizando así la cantidad de energía necesaria para romperlos; y/o ii) atrayendo a las sustancias reaccionantes hacia su superficie de modo que aumente la posibilidad de encuentro y que la reacción se produzca fácilmente (Sánchez, 2002).

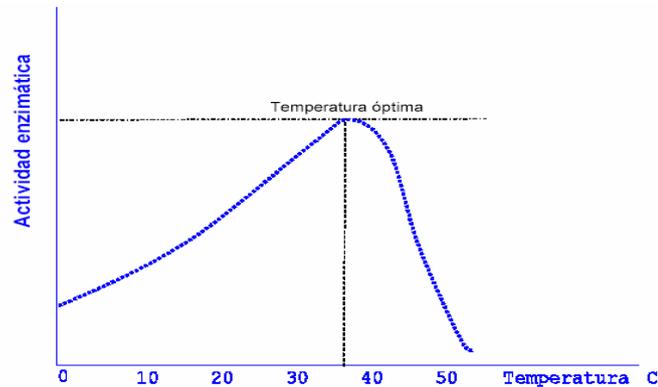
De este modo, la actividad de una enzima refleja la capacidad que tiene de transformar un sustrato determinado en producto, en una unidad de tiempo. Las enzimas, una vez que han realizado la transformación del sustrato(s) en productos, se liberan rápidamente de ellos para permitir el acceso a otros sustratos. Las enzimas suelen formar complejos multienzimáticos, de forma que el producto de una enzima constituye el sustrato de la siguiente. Por tal razón, no se requiere una elevada concentración del sustrato.

### ***Factores que Afectan la Actividad Enzimática***

La actividad de una enzima depende de ciertos factores, tales como: la temperatura, el pH, la concentración del sustrato, entre otros.

#### ***(a) Efecto de la Temperatura***

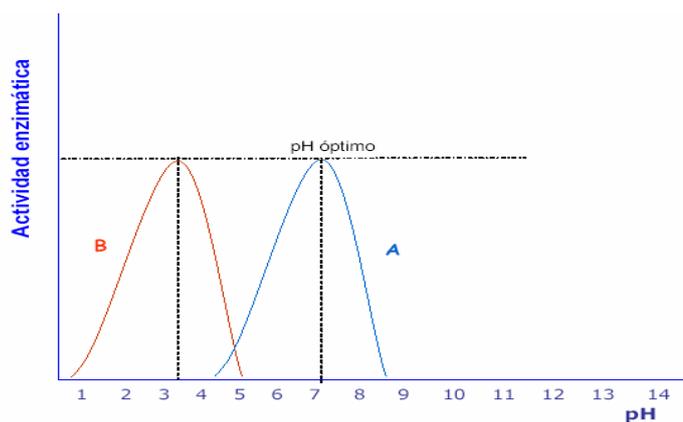
Si a una reacción enzimática se suministra energía en forma de calor, esta es transformada a energía cinética por las moléculas, aumentando de esta forma su movilidad y por tanto el número de encuentros intermoleculares. Si la temperatura es excesiva, es decir, mayor de 45 °C la enzima se desnatura perdiendo totalmente sus propiedades, lo cual detiene la actividad enzimática (fig. 20). Existe una temperatura óptima para la cual la actividad enzimática es máxima.



**Figura 20.** Variación de la actividad enzimática en función de la temperatura (Sánchez, 2002)

(b) *Efecto del pH*

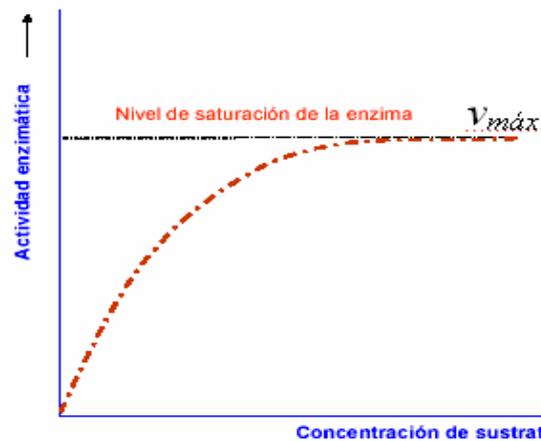
El pH no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones. Cualquier cambio de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, por lo que se puede producir un cambio en el centro activo de la enzima afectando así sus propiedades catalíticas (Enzimas, 2006). Todas las enzimas tienen dos valores límite de pH entre los cuales son efectivas, tras pasados estos valores, la enzima se desnatura y deja de actuar. Entre estos límites existe un pH óptimo (fig. 21), el cual depende del tipo de enzima y del sustrato, por medio del cual la enzima posee una máxima efectividad.



**Figura 21.** Variación de la actividad enzimática de la enzima A y B en función del pH (Sánchez, 2002)

(c) *Efecto de la Concentración del Sustrato*

En una reacción enzimática, al aumentar la concentración del sustrato, manteniendo la concentración de la enzima constante, se obtiene una velocidad máxima por encima de la cual no hay un aumento en la velocidad de la reacción (fig. 22). A concentraciones bajas, un aumento en la concentración del sustrato produce un aumento en la velocidad de reacción. Después de que se alcanza una velocidad máxima  $v_{m\acute{a}x}$ , un aumento en la concentración del sustrato no tiene ningún efecto en la velocidad de la reacción. A una cierta concentración del sustrato, todos los sitios activos están ocupados por las moléculas del sustrato; por lo tanto, todas las demás moléculas del sustrato deben esperar hasta que se encuentre libre un sitio activo antes de que ellas puedan entrar. A una concentración por debajo de este nivel, los sitios activos no están todos completamente llenos. Por lo tanto, las moléculas de sustrato se procesan tan rápidamente como entran al sitio activo (Bohinski, 1987).

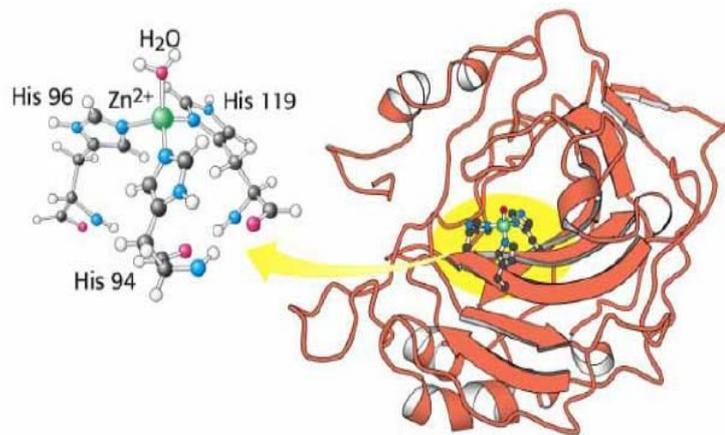


**Figura 22.** Variación de la actividad enzimática en función de la concentración del sustrato (Sánchez, 2002)

***Modelo de Actuación de una Enzima***

Una enzima posee aminoácidos de fijación o centro de fijación (aminoácidos encargados de establecer enlaces débiles con el sustrato), los cuales se disponen en el

espacio de forma que pueden establecer enlaces con los radicales de la molécula de sustrato. Esto origina una especificidad entre la enzima y el sustrato, ya que sólo se producirá actividad enzimática cuando los radicales de los aminoácidos de fijación coincidan espacialmente con radicales del sustrato y permitan su unión (fig. 23) (Enzimas, 2006).

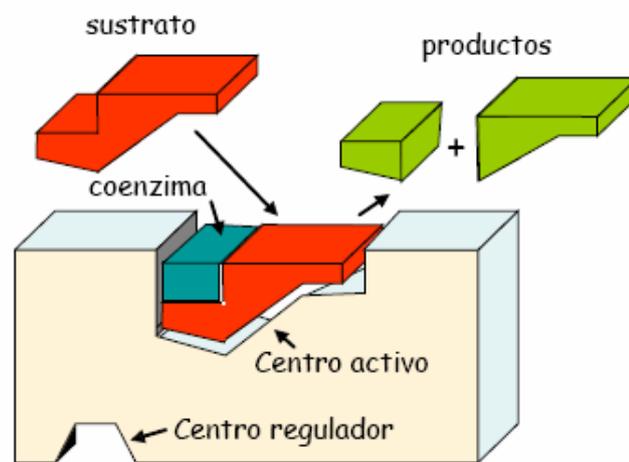


**Figura 23.** Estructura y aminoácidos de fijación en una enzima (Enzimas, 2006)

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura, mientras que otras necesitan, además, uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión metálico o bien una molécula orgánica, llamada coenzima.

El modelo actual más aceptado, es el de la enzima flexible (modelo de *Koshland*), que sugiere que el sitio activo no necesita ser una cavidad geométrica rígida, sino que debe tener una disposición espacial, precisa y específica de ciertos grupos de la enzima que al interactuar con el sustrato se adaptan y ajustan a su estructura (Sánchez, 2002). Una representación esquemática de este proceso se describe brevemente en los siguientes pasos:

- (a) Se forma un complejo enzima (E)-sustrato (S). El sustrato (S) y la coenzima, si es necesaria, se unen al centro activo de la enzima (fig. 24).
- (b) Los restos de los aminoácidos que conforman el centro activo catalizan el proceso, debilitando los enlaces necesarios para que la reacción química se lleve a cabo a baja temperatura y no se requiera una elevada energía de activación.



**Figura 24.** Transformación de un sustrato por acción de una enzima (Sánchez, 2002)

- (c) Los productos de la reacción se separan del centro activo y la enzima se recupera intacta para nuevas catálisis, tal como se observa en la figura anterior.

### ***Clasificación de las Enzimas***

Según la función que realizan las enzimas, se clasifican en seis grupos: i) oxidoreductasas; ii) transferasas; iii) hidrolasas; iv) liasas; v) isomerasas; y vi) ligasas o sintetisas. En este trabajo se estudiarán las enzimas pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas, las cuales catalizan reacciones en las que tiene lugar una oxidación o reducción del sustrato. Estas enzimas actúan sobre enlaces CH-OH, C=O, C=CH-, CH-NH<sub>2</sub> y CH-NH-.

## CAPÍTULO III

### ANTECEDENTES

Los antecedentes de este trabajo se basan en algunas investigaciones de interés sobre la biodegradación de las moléculas más pesadas de un crudo, los asfaltenos, empleando microorganismos (bacterias y hongos), con el objetivo de realizar un biotratamiento del CXP.

Algunos de los trabajos realizados en el biotratamiento del CXP se describen a continuación:

Oudot y col. (1993), aislaron cepas de hongos degradadores de hidrocarburos de ambientes tropicales en Indonesia contaminados por derrames de petróleo; el suelo de un bosque y los sedimentos de un río. Se identificaron los miembros de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocadium*, *Emericella*, *Graphium*, *Acremonium*, *Eupenicillium* y *Talaromyces*. La determinación del potencial de biodegradación de estas cepas fue realizada de acuerdo al método de Oudot (1984), el cual fue monitoreado midiendo la velocidad de degradación de todas las fracciones del petróleo (hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos). Las cepas más activas sobre todo el petróleo y en especial sobre la asimilación de saturados (> 40 %) y aromáticos (> 30 %) fueron *Emericella nidulans*, *Graphium putredinis*, *Eupenicillium javanicum* y *Aspergillus flavipes*. En el caso de las resinas y los asfaltenos la actividad degradativa fue un poco inferior, la cual se mantuvo en el rango de 15-28 % en el caso de las resinas y entre 15-40 % en el caso de los asfaltenos. Los cultivos monoespecíficos fueron tan eficientes como los cultivos mezclados. Con estos resultados se logro demostrar que las capacidades degradativas

de los hongos son al menos tan altas como la de las bacterias que degradan hidrocarburos.

Pineda y col. (2002), el objetivo de este trabajo consistió en determinar la oxidación y la mineralización de asfaltenos como única fuente de carbono y energía, por un consorcio microbiano aislado del petróleo tipo Maya (México). El consorcio microbiano se aisló de una muestra de crudo y se estabilizó su crecimiento en un reactor de columna con asfaltenos. Se observó durante la evaluación el consorcio integrado por cuatro cepas bacterianas (*Corynebacterium*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus brevis* y *Staphylococcus*), cuyo crecimiento con asfaltenos como única fuente de carbono y energía, aumentó notablemente durante las dos primeras semanas de incubación. Se evaluó el consumo de oxígeno (técnica de Winkler) y la producción de dióxido de carbono (método ISO9439) con 0,1 % de asfaltenos por un lapso de tiempo entre 20 y 13 días. El consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> fueron significativamente mayores (100% en 15 días y 800 μmol de CO<sub>2</sub>, respectivamente) cuando el consorcio estuvo en contacto con los asfaltenos. El consorcio microbiano estabilizado fue capaz de realizar la oxidación y la mineralización de los asfaltenos extraídos del petróleo.

Vásquez-Duhalt y col. (2002), la patente se refiere a un método para eliminar compuestos tiofénicos y sulfuros orgánicos de un combustible fósil por medio de las siguientes etapas: i) se ponen en contacto el combustible fósil con las hemoproteínas, las cuales oxidan a los compuestos que contienen azufre a sulfóxidos y sulfonas, ii) se eliminan los sulfóxidos y sulfonas del combustible por medio de una destilación. Entre los biocatalizadores seleccionados están las hemoproteínas tales como: cloroperoxidasa, obtenida a partir del hongo *Caldariomyces fumago*, peroxidasa y citocromos de células microbianas, plantas o animales. La reacción puede llevarse a cabo únicamente con la presencia del combustible o con adición de algún solvente orgánico. Luego, el combustible oxidado biocatalíticamente es destilado con el objetivo de eliminar la fracción pesada que contiene la mayoría de los compuestos

organosulfurados oxidados. El destilado más ligero contiene concentraciones significativamente más bajas de azufre cuando se compara con el combustible fósil de partida.

Zheng (2002), en este trabajo se investigaron los factores claves que afectan la oxidación de HPAs por el hongo de la podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* entre ellos las concentraciones de  $Mn^{2+}$  sobre la producción de enzimas extracelulares y las fuentes de HPAs. Este hongo actúa con microorganismos autóctonos de los suelos en la oxidación de HPAs de bajo peso molecular (naftaleno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno y pireno), en un suelo lodoso donde la oxidación fue llevada por encima del 43 % en la presencia del hongo. Sin embargo, los compuestos de alto peso molecular (criseno, benzo(a)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno), experimentaron una oxidación limitada. En contraste, los HPAs pireno y benzo(a)pireno disueltos en un surfactante fueron eficientemente oxidados (la recuperación fue menor de 16,3 % y 0,35 % respectivamente).

En general los resultados muestran que la velocidad de disolución de los HPAs es el factor limitante en la oxidación de estos compuestos en los suelos contaminados. La concentración de  $Mn^{2+}$  regula fuertemente la producción de manganeso peroxidasa (MnPp), por otra parte, aunque un incremento de la concentración de  $Mn^{2+}$  en el medio de cultivo resulto ser beneficiosa para la oxidación de HPAs disuelto en un surfactante, aunque no es un prerrequisito para que se pueda llevar a cabo esta oxidación.

Arellano y col. (2004) en este trabajo se demuestra que el citocromo C modificado es capaz de realizar la transformación de una variedad de porfirinas sintéticas y de una fracción de asfaltenos rica en porfirinas, bajo condiciones suaves y en la presencia de concentraciones milimolares de peróxidos. Para ello se realizó una doble modificación al citocromo C del corazón de un caballo. Se obtuvo un biocatalizador soluble en compuestos orgánicos además de alcanzar un incremento en la

hidrofobicidad de su sitio activo, lográndose así un mejor acceso del sustrato al sitio activo de la hemoproteína. Durante la reacción se liberaron los metales coordinados principalmente Ni y V del anillo porfirínico, encontrándose una pérdida en la fracción asfáltica de 95 % de V y 75 % Ni. Esta remoción enzimática de metales pesados contenidos en los asfaltos es una alternativa interesante para reducir el envenenamiento de los catalizadores en los procesos de craqueo e hidrocraqueo catalítico durante la refinación de este tipo de crudo.

Chaillan y col. (2004), analizaron un cultivo de microorganismos aeróbicos degradadores de hidrocarburos, aislados de suelos contaminados con petróleo en Indonesia, dando como resultado la colección de 33 especies diferentes. Ocho bacterias, 21 hongos y 4 levaduras fueron identificados de manera específica por técnicas molecular y fenotípica. Las cepas bacteriales pertenecen a los géneros *Godornia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia* y otras. Los hongos pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* y *Graphium*. Las levaduras fueron *Candida*, *Yarrowia* y *Pichia*. Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido sintético suplementado con crudo como única fuente de carbono y energía. La composición química detallada del crudo luego del tratamiento fue estudiada por técnicas gravimétricas y cromatografía de gases. Se establecieron trece parámetros para investigar el potencial de degradación de cada cepa.

La máxima degradación fue observada sobre los hidrocarburos saturados (n- isoalcanos, isoprenoides), siendo degradados extensivamente (100 %), mientras que la degradación de los hidrocarburos aromáticos fue más baja (0-17 %) y fue relacionada a la composición estructural de las moléculas. Se encontró que las cepas más activas produjeron metabolitos polares los cuales se acumularon en las fracciones de asfaltos y resinas, haciendo a estas fracciones altamente resistentes al metabolismo microbiano. Sin embargo, se encontró en algunos de estos microorganismos una ligera actividad biodegradante (10-15 %) sobre esas fracciones.

Van Hamme y col. (2004), este trabajo esboza la síntesis y uso de bis-(3-pentafluorofenilpropil)-sulfuro (PFPS) como un compuesto novedoso para seleccionar y caracterizar cepas bacterianas capaces de romper enlaces C-S dentro de cadenas alquílicas que pueden estar presentes en la fracción residual de crudos pesados y bitúmenes. La bacteria *Rhodococcus* (JVH1) empleó PFPS como la única fuente de azufre y fue la única cepa aislada de ambientes contaminados con crudo. Los análisis mostraron que JVH1 oxida PFPS a un sulfóxido y luego a una sulfona antes de la ruptura del enlace C-S. Se presenta además la ruta metabólica que implica la oxidación específica del azufre y clivaje del enlace C-S. Esta actividad de desulfuración bacteriana resulta valiosa en el campo de la industria petrolera, donde se tiene gran interés en desarrollar métodos microbianos que remuevan el azufre de compuestos organosulfurados para así reducir las emisiones de compuestos tóxicos de azufre y más recientemente para reducir la viscosidad de los crudos pesados.

Baborova y col. (2006), el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar la enzima manganeso peroxidasa, producida por el hongo *Irpex lacteus* como la principal enzima ligninolítica en la mayoría de las condiciones de cultivo empleadas, además de investigar su capacidad para degradar hidrocarburos poliaromáticos (HPAs). El hongo de la podredumbre blanca *I. lacteus* se ha reportado como un eficiente degradador de los HPAs. El hongo produjo las enzimas ligninolíticas lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, siendo esta última producida en mayor cantidad. Se ensayó la degradación de cuatro HPAs (fenantreno, antraceno fluoranteno y pireno) y se encontró que la enzima fue capaz de degradar todos los HPAs estudiados *in vitro* a diferentes velocidades. El antraceno y el pireno fueron degradados extensivamente a 0 y 8,3 % respectivamente de su concentración original, mientras que la recuperación de fenantreno y fluoranteno después de 168 horas de degradación fue de 56 y 58,1 % respectivamente.

Naranjo y col. (2007), proponen el uso de enzimas oxidativas extracelulares (EOE) a partir del sistema enzimático de hongos que degradan la lignina (SEDL), como

catalizadores biológicos, para el mejoramiento enzimático del crudo extrapesado (CXP) de la faja petrolífera del Orinoco en Venezuela. Se aislaron cepas de hongos autóctonos capaces de utilizar CXP y varios HPAs como única fuente de carbono y energía de suelos contaminados con CXP e identificados como pertenecientes a los géneros: *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Pseudallescheria*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* y *Paecilomyces*. Ensayos fenotípicos y bioquímicos revelaron la capacidad de estos hongos filamentosos para sintetizar EOE sugiriendo así la relación entre el SEDL y la bioconversión del CXP. El hongo *Fusarium solani* HP-1 fue seleccionado para realizar los experimentos, debido a su alta capacidad para metabolizar HPAs y CXP. Los resultados sugirieron que esta cepa es capaz de sintetizar EOE. Las actividades de estas enzimas fueron inducidas poderosamente por CXP, por lo que queda establecida una relación hipotética entre el SEDL y la bioconversión del CXP.

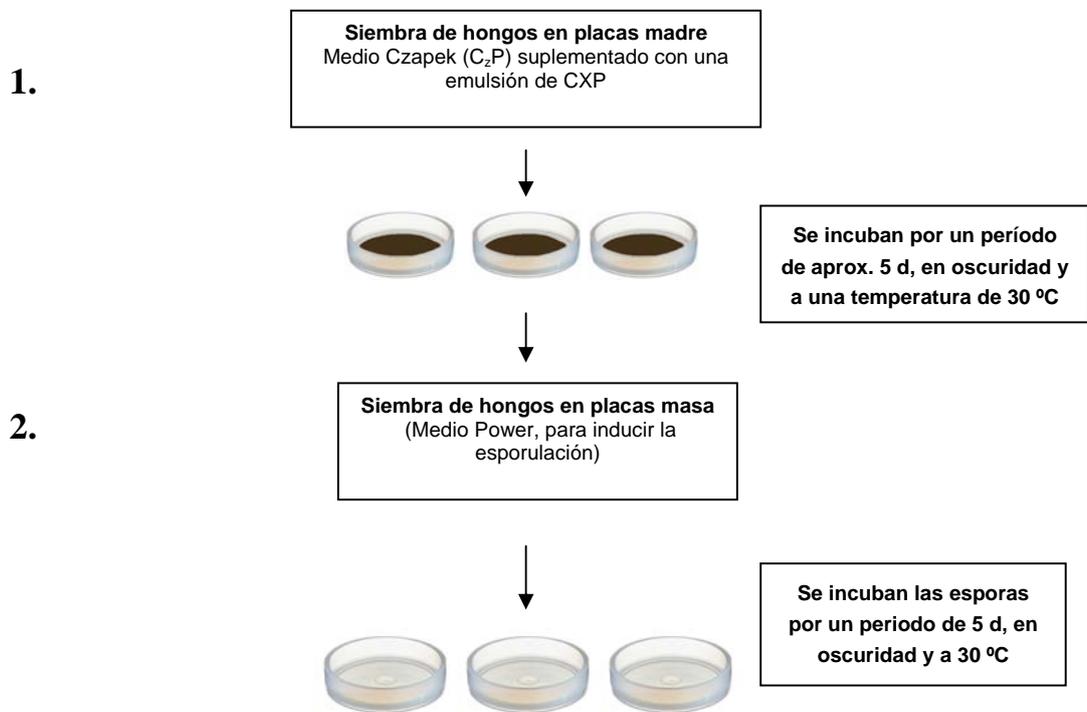
## CAPÍTULO IV

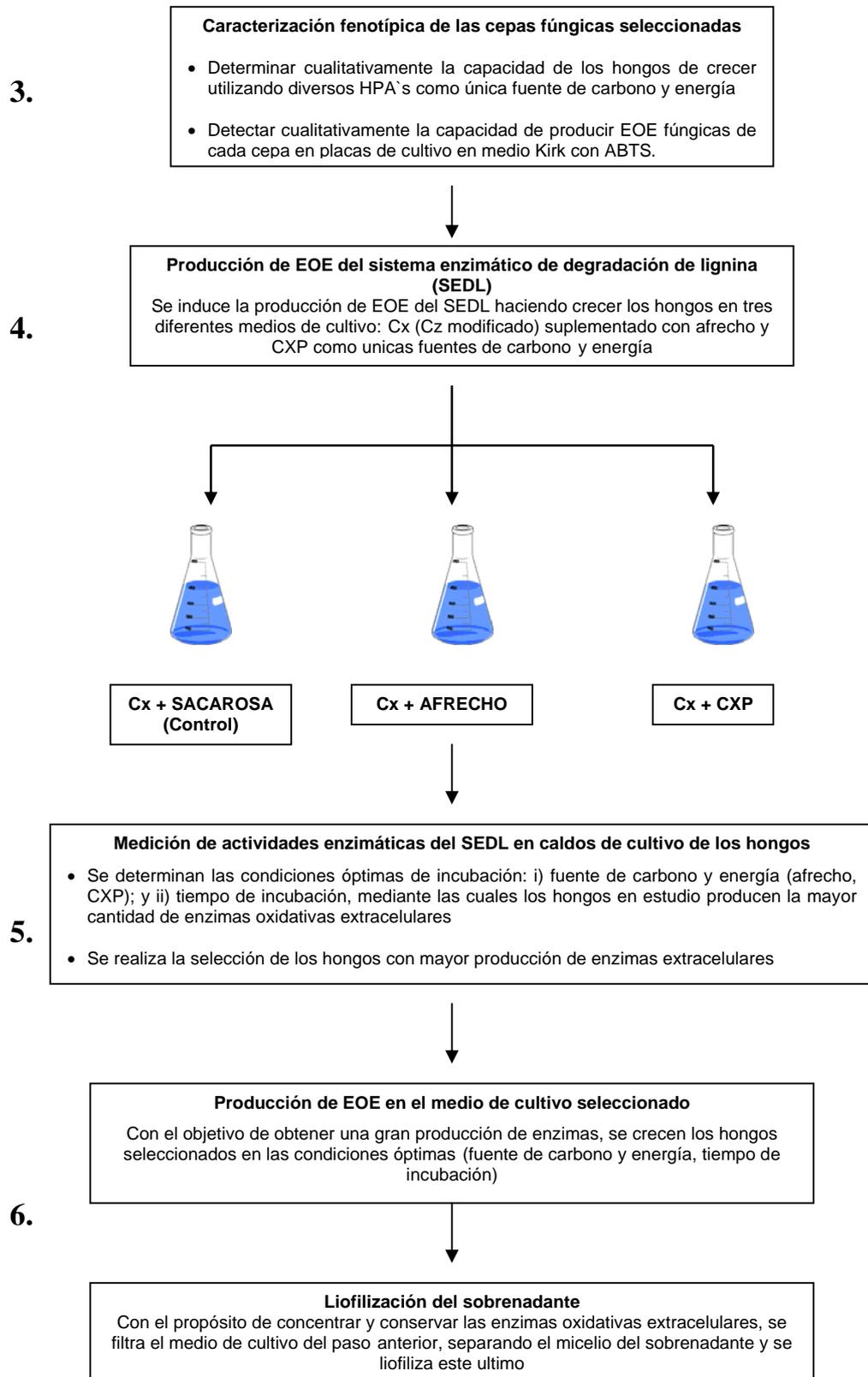
### MARCO METODOLÓGICO

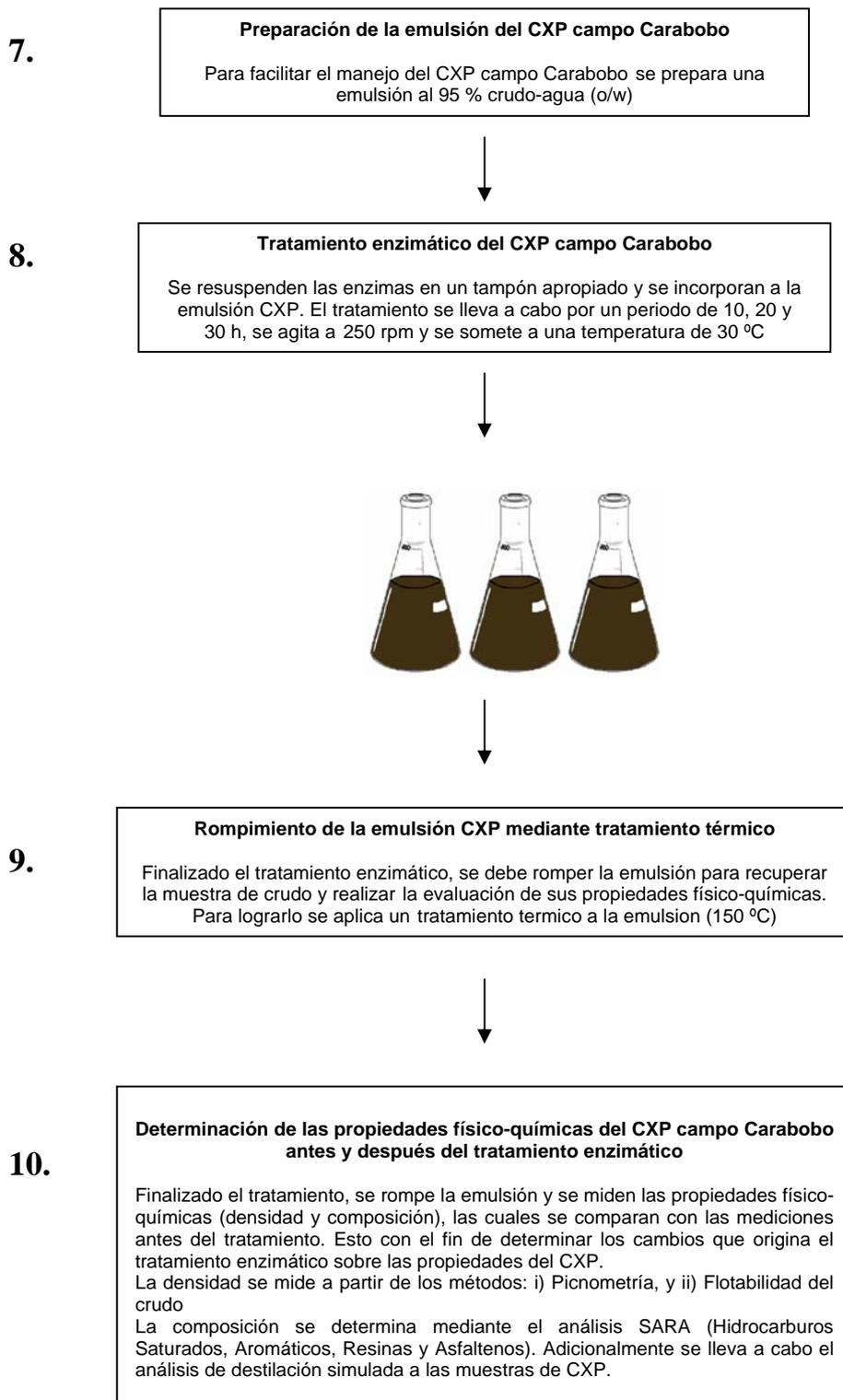
En este capítulo se describe la metodología empleada en este trabajo de investigación, así como los reactivos, equipos y procedimientos experimentales utilizados para llevar a cabo el biotratamiento del CXP campo Carabobo, utilizando las enzimas oxidativas extracelulares de las cepas fúngicas: BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 pertenecientes al Phylum Ascomycota.

#### Esquema General de la Metodología

A continuación se presenta un esquema general que ilustra la metodología que se llevo cabo en este trabajo de investigación:







## Reactivos

La Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA (Unidad de Biotecnología del Petróleo) proporcionó todos los materiales, reactivos y equipos requeridos para el desarrollo de este trabajo especial de grado. Las muestras de CXP provienen del área de producción de la faja petrolífera del Orinoco campo Carabobo (anteriormente Cerro Negro), cuya gravedad API oscila entre 8-10 °API (Naranjo y col., 2007). Las cepas fúngicas empleadas en el estudio provienen del lago de asfalto natural de Guanoco (Estado Sucre), fueron aisladas por el personal de la Fundación como se describe en la bibliografía (Naranjo y col., 2007).

Los reactivos empleados para el desarrollo del trabajo se indican a continuación: Agar USP Grade y glicerol, se adquieren a **MP Biomedicals, Inc.** Sulfato de manganeso, peróxido de hidrógeno, alúmina grado cromatográfico (GC) (WN-3 Neutral), sal de amonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (98%) (ABTS), sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro férrico hexahidratado, cloruro de sodio puro, ácido cítrico, cloruro de calcio y cloruro de amonio, se adquieren a **Sigma**. Pireno (98%), 3,4-dimetoxibenzil alcohol (96%) (alcohol veratrílico), 2,6-dimetoxifenol (99%) (DMP), Fenantreno (98%), dibenzotiofeno (98 %) (DBT) se adquieren a **Aldrich**. Etanol absoluto (para biología molecular) y L-(+)-ácido tartárico (Sigma-Ultra) se adquieren a Sigma-Aldrich. Hexano y cloroformo se adquieren a Burdick & Jackson. Las sustancias: fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), Coomassie Plus-The Better Bradford (Bradford), tartrato de sodio, nitrato de potasio y tridecanol etoxilado (Detex TDA-15) (surfactante) se adquieren a **Pierce, Assay™ Reagent, Analar, Merck y Arch Química Andina C.A.**, respectivamente. Tolueno, hidrogenofosfato de potasio y dihidrogenofosfato de potasio se adquieren a **Riedel-de Haën**. Otros reactivos:, sulfato de hierro heptahidratado, peptona, sólido de maceración de maíz, lactosa, sulfato de cobre pentahidratado, ácido clorhídrico, naftaleno, glucosa, sacarosa, extracto de levadura, hidrogenofosfato de sodio, etanol técnico y Suero de Albumina Bovin (BSA; por sus siglas en inglés).

**Medios de Cultivo Fúngicos**

- *Medio para el crecimiento y mantenimiento*

## Medio Czapek (Cz)

Sacarosa	30 g
KNO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

- *Medio para la esporulación*

## Medio PM1 (Pm)

Peptona	5 g
Sólido de maceración de maíz	1 g
Lactosa	5 g
NaCl	4 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,1 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,3 mL
Agar	20 g
Agua destilada	1 L
pH 5,5 ajustando con HCl 1N	

## Medio Power (Pw)

PM1	0,5 L
Czapek	0,5 L

## Medio kirk (Kk)

Glucosa	0,5 L
Extracto de levadura	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
Acido succínico	2,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
Agar	22 g
Agua destilada	1 L

**Equipos**

Se emplearon los siguientes equipos: autoclave o esterilizador, campana de flujo laminar modelo AV-100 marca Telstar, mufla modelo 1300 marca Thermolyne, centrifugadoras marca Eppendorf: modelo 5810R (refrigerada de 15 amp) y modelo 5424, refrigerador C, 340 Premiun (Ultra Low Temperatura Freezer, -80 °C), espectrofotómetro Lambda 35 UV/VIS marca Perkin Elmer Instruments, liofilizador Labconco, microscopio Axioskope 40 marca Zeiss, rotavapor RE500 marca Yamato, incubadora con agitación orbital 311DS marca Labnet.

**Procedimiento Experimental**

El desarrollo experimental de la investigación comprendió las siguientes secciones:

### ***Mantenimiento y Crecimiento de los hongos***

El mantenimiento de las cepas fúngicas se llevó a cabo en medio Cz suplementado con CXP para mantener la presión selectiva.

#### *i. Medio de mantenimiento*

1. Los hongos aislados previamente en la Unidad de Biotecnología del IDEA y pertenecientes al banco de microorganismos de la Unidad de biotecnología del Petróleo, se sembraron en placas madre, donde crecieron en un medio de cultivo sólido denominado Czapek ( $C_Z^P$ ) con  $\frac{1}{4}$  de sacarosa de la que contiene el medio de cultivo Cz (Peláez y col., 1995; Naranjo y col., 2005) y suplementado con 1 % de CXP como fuentes de carbono y energía.

El crecimiento de los hongos se llevó a cabo de la siguiente manera:

#### *ii. Medio de esporulación (Pw)*

2. Los hongos fueron subcultivados en placas de masa, donde crecieron en medio de cultivo Pw, a una temperatura de 30 °C por un periodo no menor a 5 días, con el fin de recolectar la cantidad máxima de esporas. El medio de cultivo Power esta constituido por: i) 50 % de medio Cz; y ii) 50 % de medio Pm.
3. Estos medios se esterilizaron en el autoclave por 15 min a una presión de 5-17 psi y 121 °C. Luego en una campana de flujo laminar y ambiente estéril, se sirvió el medio en placas petri de 9 cm de diámetro y se dejó enfriar. Luego, se repicaron estas placas con las esporas de los hongos, cultivadas previamente en placas madre, y se inició el crecimiento de los mismos.

### ***Caracterización fenotípica de las cepas fúngicas seleccionadas***

La caracterización fenotípica de los hongos se llevó a cabo con la finalidad de: i) Determinar cualitativamente la capacidad de los hongos de crecer utilizando diversos HPA's como única fuente de carbono y energía; y ii) Detectar cualitativamente la capacidad de producción de enzimas oxidativas extracelulares fúngicas en placas de cultivo. Se realizará el siguiente procedimiento:

1. El crecimiento de los hongos se llevó a cabo en placas de masa con medio Cx (medio Cz con limitación de fuente de nitrógeno), suplementado con varios HPA's (naftaleno, DBT, fenantreno y pireno) como única fuente de carbono y energía a una concentración de 200 ppm. De igual forma, se llevó a cabo el crecimiento de las cepas en placas de masa con una concentración 200 ppm de CXP y un control con sacarosa como únicas fuentes de carbono y energía (Naranjo y col., 2007).
2. La detección de la producción de enzimas oxidativas extracelulares fúngicas, se llevó a cabo por medio de su crecimiento en el medio de cultivo Kirk sólido con ABTS (Saparrat y col., 2000). El cromógeno ABTS, es un sustrato muy sensible que permite una búsqueda rápida de cepas fúngicas que producen las enzimas oxidativas extracelulares por medio de un ensayo colorimétrico.
3. Cada una de las cepas fueron procesadas por duplicado, se incubaron en la oscuridad, a una temperatura de 30 °C y por un periodo de 7 a 21 d.
4. Se utilizaron para este ensayo dos escalas basadas en: i) el crecimiento del hongo en la placa; y ii) la intensidad en el color del medio. Las escalas se definieron de la siguiente forma: i) escala de crecimiento: sin crecimiento (-), crecimiento bajo (+), crecimiento moderado (++) y buen crecimiento (+++); y ii) escala colorimétrica: incoloro (-) (sin actividad oxidativa de ABTS), intensidad de color baja (+), intensidad de color moderada (++) y intensidad de color elevada (+++) (alta actividad oxidativa de ABTS).

---

***Producción de enzimas oxidativas extracelulares (EOE) del sistema enzimático de degradación de lignina (SEDL)***

En este ensayo se indujo la producción de EOE del SEDL de los hongos, utilizando diversas fuentes de carbono y energía: i) se emplea afrecho como sustrato ligninolítico, ii) como sustrato de interés se utiliza CXP; y iii) como control se utiliza sacarosa como única fuente de carbono y energía afrecho. Para realizar esta prueba se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

1. Una vez transcurrido el tiempo mínimo de crecimiento de los hongos en placas de masa (medio que induce la esporulación), se cosecharon las esporas en 9 placas masa de cada uno de los hongos y se colocaron por separado en un vaso de precipitado. Se llevó a un volumen de 90 mL, utilizando una solución salina estéril (NaCl) al 0,9 %.
2. Se agitó bien y se distribuyó la mezcla en 6 tubos falcón de 15 mL de capacidad (con el fin de agregar una cantidad similar de esporas en cada tubo falcón), se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante.
3. Se inocularon las esporas frescas en medio líquido Cx utilizando las siguientes fuentes de carbono y energía: i) 1 % afrecho, , ii) 1 % emulsión de CXP; y iii) 1,5 g de sacarosa (control). Para ello, se utilizaron matraces de 250 mL, donde se agregó un volumen final de 50 mL constituido de medio de cultivo Cx con la suspensión de esporas.
4. Cada una de las cepas se procesaron por duplicado, se incubaron en agitación orbital (250 rpm), a una temperatura de 30 °C y por 5 d.

***Medición de actividades enzimáticas del SEDL en caldos de cultivo de los hongos***

Para cumplir con los objetivos propuestos se realizó el estudio enzimático con el fin de determinar las condiciones de incubación óptimas (fuente de carbono y energía, y

tiempo de incubación), en las que se obtiene la mayor producción de enzimas oxidativas extracelulares. Este ensayo se realizó mediante el siguiente procedimiento:

1. Se recolectó 1 mL de sobrenadante de cultivo de cada uno de los matraces empleados en el ensayo anterior, cada 24 h y por un periodo de 5d.
2. Se centrifugó cada muestra, para obtener el sobrenadante limpio, libre del micelio del hongo.
3. Se trasvasó el sobrenadante y se distribuyó en 3 tubos eppendorf (agregando a dos de ellos 10 % de glicerol) y conservando a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se agregó a cada tubo inhibidor de proteasa PMSF hasta alcanzar una concentración final de 0,2 mM, con la finalidad de evitar la degradación de las EOE de interés (LiPp, MnPp y LACp).

Las actividades de estas enzimas ligninolíticas se determinaron empleando una mezcla de reacción constituida por un tampón y sustratos adecuados requeridos para cada enzima, mediante el siguiente protocolo:

- (a) La actividad de la LiP fue analizada por medio de la oxidación del alcohol veratrílico, en una mezcla de reacción que contenía: 0,25 mL de alcohol veratrílico (20 mM) en un buffer 0,5 M de fosfato de sodio (pH 3,0), como agente oxidante 0,04 mL de solución de peróxido de hidrógeno al 30 % y 0,04 mL del cultivo enzimático. La oxidación del alcohol veratrílico fue monitoreada de 0-200 s por medio del incremento de la absorbancia a 310 nm. La unidad de actividad enzimática (U) se definió como: 1  $\mu\text{M}$  alcohol veratrílico oxidado por mL de sobrenadante en un min ( $\epsilon_{310} = 9,3\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Troller y col., 1988).
- (b) La actividad de la MnP fue analizada por medio de la oxidación del rojo de fenol, en una mezcla de reacción constituida por: 0,1 mL de rojo de fenol (0,1 %) en un buffer 0,5 M de fosfato de sodio (pH 5,0), cofactor 0,1 mL de sulfato de manganeso (1 mM) y 0,04 mL del cultivo enzimático. La oxidación

del rojo de fenol fue monitoreada de 0-200 s por medio del incremento de la absorbancia a 610 nm. La unidad de actividad enzimática (U) se definió como: 1  $\mu\text{M}$  rojo de fenol oxidado por mL de sobrenadante en un min ( $\epsilon_{610} = 22,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Papinutti, Diorio y Forchiassin, 2003)

- (c) La actividad de la Lac fue analizada por medio de la oxidación del ABTS en una mezcla de reacción constituida por: 0,01 mL de ABTS (25 mM) en un buffer 0,1 M de tartrato de sodio (pH 5,0) y 0,04 mL del cultivo enzimático. La oxidación del ABTS fue monitoreada de 0-200 s por medio del incremento de la absorbancia a 436 nm. La unidad de actividad enzimática (U) se definió como: 1  $\mu\text{M}$  ABTS oxidado por mL de sobrenadante en un min ( $\epsilon_{436} = 29,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Saparrat y col., 2002).
- (d) Con los datos de absorbancia (A) y tiempo (t) se construyó una grafica A vs t, y se determinó la pendiente de la recta obtenida ( $\Delta A/\Delta t$ ), luego, la actividad enzimática se obtuvo a partir de la ecuación (2).

$$A.E = \frac{\Delta abs}{\Delta t * V.s * \epsilon * b} \quad (2)$$

Donde:

*A.E*: Actividad enzimática ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

$\Delta abs$ : Variación de absorbancia ( $\Delta abs$ )

$\Delta t$ : Variación de tiempo (min)

*V.s*: Volumen del sobrenadante de cultivo (mL)

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

*b*: Espesor de la celda (cm)

- (e) Se construyó la curva de calibración del Bradford, a partir de una solución con una concentración de Suero de Albúmina Bovin (BSA). Para ello se preparó un mínimo de 10 soluciones, cuya concentración varió entre 0,1-1 mg/mL de

BSA. A partir de los datos de absorbancia se construyó la curva de calibración del Bradford A vs. m (ecuación 3):

$$A = 1,1507 * m + 0,0077 \quad (3)$$

Donde:

A : Absorbancia de la muestra de enzima (abs)

m : Concentración de proteína (mg/mL)

- (f) La concentración de proteína se determinó empleando una mezcla constituida por: 0,025 mL de la muestra que contiene la enzima y 0,75 mL de Bradford. Se midió la absorbancia de la masa total de enzimas a una longitud de onda de 595 nm.
- (g) La unidad de actividad enzimática (U) se determinó dividiendo la actividad enzimática entre la concentración (mg/mL) de la proteína. Con estos datos se generó la curva U vs. t.
- (h) A partir de los valores máximos de U, se determinaron las mejores condiciones de incubación (medio de cultivo y tiempo de fermentación), así como, la selección de aquellos hongos que tuvieron la capacidad de producir una mayor cantidad de enzimas.

### ***Liofilización del sobrenadante***

Con el propósito de concentrar y preservar las enzimas y cumpliendo con los objetivos propuestos, se llevó a cabo el proceso de liofilización. Para ello se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se inocularon los hongos, en esta ocasión aumentando el número de placas masa y el volumen del medio de cultivo (800 mL), con el fin de producir una mayor cantidad de enzimas. Para ello se tomaron dos matraces de 1 L de

capacidad, se cosecharon 15 placas de masa por cada hongo en 400 mL de medio de cultivo, siguiendo un procedimiento similar al de la sección de medición de actividades del SEDL.

2. Se incubaron en una estufa con agitación orbital (250 rpm), a una temperatura de 30 °C y durante el tiempo óptimo determinado en la sección de medición de actividades del SEDL.
3. Se centrifugó la solución, a 16.000 rpm en una ultra centrifuga para precipitar el micelio del hongo y todos los compuestos sólidos en suspensión presentes en el medio. Se filtró para separar el sobrenadante del micelio del hongo y otros compuestos sólidos.
4. Se trasvasó el sobrenadante a un vaso de precipitado y se conservó a una temperatura de -70 °C por un periodo mínimo de 48 h.
5. Finalmente, la muestra congelada se liofilizó (deshidratación de las enzimas por sublimación del agua) para concentrar y preservar las enzimas.

#### ***Preparación de la emulsión del CXP campo Carabobo***

Para facilitar el manejo del CXP campo Carabobo se preparó una emulsión con agua (o/w), mediante el siguiente procedimiento:

1. En un vaso de precipitado de 1 L se mezclaron 190 g de CXP y una solución de surfactante en agua de concentración 5000 ppm.
2. El recipiente se calentó en baño de maría hasta que la mezcla alcanzó una temperatura de 60 °C aproximadamente.
3. Empleando un agitador Rustond, se preparó una mezcla uniforme entre el crudo, surfactante y el agua. Para lograrlo se agitó durante 30 min, tiempo necesario para formar la emulsión al 95 % o/w

***Tratamiento enzimático del CXP campo Carabobo***

Para aumentar el área de contacto entre el crudo y la enzima, y poder llevar a cabo el mejoramiento se preparó una emulsión al 50 % o/w, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

1. Las enzimas liofilizadas en la sección anterior (*liofilización del sobrenadante*), se suspendieron en un tampón apropiado, es decir, se disolvieron en 50 mL del buffer correspondiente a la enzima de interés.
2. En un matraz de 250 mL de capacidad, se agregó 50 mL de la emulsión del CXP 95 % o/w y se incorporaron 50 mL del tampón con las enzimas. Se agitó bien y de esta manera se inició el tratamiento enzimático del CXP.
3. Se incubaron los matraces en la estufa a 250 rpm, a una temperatura de 30 °C y por un periodo de 10 a 30 h.

***Rompimiento de la emulsión mediante tratamiento térmico***

Finalizado el tratamiento enzimático, se rompió la emulsión para recuperar la muestra de crudo biotratada y llevar a cabo la evaluación de sus propiedades físico-químicas. Para lograrlo se aplicó un tratamiento térmico a la emulsión, mediante un sistema conformado por: un recipiente hermético y una plancha de calentamiento. El procedimiento experimental se describe a continuación:

1. Se agregó la emulsión al recipiente herméticamente cerrado y se colocó sobre la plancha de calentamiento entre 150-200 °C, por un periodo de 2h.
2. La fase acuosa se separó de la fase oleosa, esta última al ser más densa, se depositó en el fondo del recipiente. Luego, se decantó con cuidado la fase acuosa y la fase oleosa se trasvasó a otro recipiente.
3. Para eliminar las trazas de agua, que pudieron estar presentes en la muestra, se calentó nuevamente a una temperatura de 100 °C por unos 30 min.

4. Luego, se aplicó un tratamiento térmico a la muestra (temperatura de 350 °C), con el fin de romper los enlaces internos de las moléculas debilitados por el biotratamiento y así mejorar la composición del crudo antes de evaluar sus propiedades físico-químicas.

#### ***Determinación de las propiedades físico-químicas del CXP campo Carabobo antes y después del tratamiento enzimático***

Para cumplir con los objetivos propuestos, se evaluaron las siguientes propiedades físico-químicas del CXP antes y después del tratamiento enzimático: densidad y composición por medio del análisis SARA. El procedimiento experimental se describe a continuación:

#### ***Determinación de la densidad del crudo campo Carabobo***

La densidad del CXP campo Carabobo se determinó a partir del método de flotabilidad del crudo en una solución de densidad conocida.

La densidad del CXP campo Carabobo, se midió a partir del método de flotabilidad del crudo desarrollado en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología del Petróleo del IDEA. El método consistió en determinar la densidad de una gota de crudo a partir de una solución salina de densidad conocida, mediante el siguiente protocolo:

1. Se preparó una solución con una determinada concentración de NaCl.
2. Se calentó la muestra de crudo hasta una temperatura de 40 °C, luego con una espátula se agregó una gota de crudo a la solución salina.
3. En el instante que la gota de crudo quedó suspendida (flotabilidad neutra) en el centro de la solución, la densidad del crudo es igual a la densidad de la solución salina.

4. Para determinar la densidad, se tomó 1mL de la solución, se vertió en un eppendorf (de masa conocida), se pesó y por diferencia se determinó la masa de la solución.
5. Finalmente conocida la masa y el volumen, se determinó la densidad de la solución y por ende la del crudo, a partir de la ecuación (4)

$$\rho_s = \frac{m_s}{V_s} \quad (4)$$

Donde:

$\rho_s$  : Densidad de la solución (g/mL)

$m_s$  : Masa de la solución (g)

$V_s$  : Volumen de la solución (mL)

#### *Medida de las fracciones de hidrocarburos presentes en el crudo, análisis SARA*

Para determinar la composición de las fracciones de hidrocarburos presentes en el CXP (fracción de: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) antes y después del tratamiento enzimático, se utilizó el siguiente procedimiento (modificado de la norma ASTM- D-4124-01, 2001):

1. Se pesaron 0,5 g de emulsión 95 % o/w en un vaso de precipitado de 250 ml.
2. Se añadieron 50 ml de hexano y se agita por 1 h. La mezcla resultante se dejó en reposo por 24 h.
3. Se construyó el sistema de precipitación de asfaltenos por gravedad, el cual consistió de una fiola de 125 ml, un embudo y un papel de filtro (previamente pesado).
4. Se trasvasó con una varilla de vidrio la mezcla del vaso de precipitado al papel de filtro y se lavó con suficiente hexano, el papel y la muestra, para arrastrar la mayor cantidad de maltenos. La muestra se separó inicialmente en

dos fracciones: la fracción insoluble en hexano correspondiente a los asfaltenos y la fracción soluble denominada maltenos.

5. Para recuperar el hexano y concentrar la muestra, se sometió la solución con los maltenos a una destilación simple con vacío (50 rpm y 45 °C) en un rotavapor.
6. Se construyó el sistema de separación cromatográfica, colocando en una columna de vidrio (dimensiones: 50 cm de largo y 0,8 cm de diámetro), 20 cm de la alúmina CG, la cual fue activada a una temperatura de 200 °C en una mufla por un tiempo mínimo de 2 h.
7. Se empaquetó adecuadamente la alúmina con hexano, manteniendo un nivel de líquido, al menos 2 mm por encima de la superficie.
8. Los maltenos concentrados se vertieron despacio a la columna para ser absorbidos por la alúmina.
9. Se añadieron 100 mL de hexano, con lo cual se garantizó la completa separación de la fracción de saturados.
10. Luego se añadieron 100 mL de tolueno, para separar la fracción de aromáticos. El frente de separación se controló utilizando una lámpara de luz ultravioleta portátil y el volumen de tolueno recuperado en la fiola.
11. Finalmente, se agregaron 100 mL de cloroformo para separar la fracción de resinas.
12. Cada fracción eluída se recuperó por eliminación del solvente. Se pesó cada recipiente y por diferencia se determinó la masa de cada fracción.
13. Los asfaltenos recuperados en el papel de filtro se llevaron a peso constante en una estufa.
14. Los porcentajes de cada una de las fracciones se calcularon empleando la ecuación (5):

$$P_{fi}(\%) = \frac{m_{fi}(g)}{m_{tc}(g)} * 100\% \quad (5)$$

*Donde:*

$P_{fi}$  : Porcentaje de la fracción i (%)

$m_{fi}$  : Masa de la fracción i (g)

$m_{ic}$  : Masa total de la muestra de crudo (g)

### ***Destilación simulada***

Se realizó el análisis de destilación simulada a las muestras de CXP biotratado por 20 h con la mezcla LACp y LiPp siguiendo la norma ASTM D-7169-05.

Finalmente, se garantizó la repetitividad de los datos experimentales obtenidos realizando un duplicado a cada una de las experiencias, para conformar una cantidad total de pruebas, tal como se indica en la tabla N° 4

**Tabla N° 4.** Cantidad total de pruebas aplicadas al proceso de biomejoramiento del CXP campo Carabobo.

ENSAYO	NÚMERO DE PRUEBAS INDIVIDUALES PARA CADA ENSAYO	NÚMERO DE PRUEBAS TOTALES EN EL ENSAYO
<b>Caracterización Fenotípica</b>		
Crecimiento de los Hongos	10	20
Detección de EOE	10	
<b>Producción de EOE a partir del SEDL de cada cepa en caldos de cultivo empleando afrecho, CXP y sacarosa como únicas fuentes de carbono y energía</b>		
Fuente Sacarosa	8	24
Fuente Afrecho	8	
Fuente CXP	8	
<b>Medición de actividades enzimáticas del SEDL en caldos de cultivo empleando diversas fuentes de carbono y energía</b>		
Actividad LACp	60	180
Actividad LiPp	60	
Actividad MnPp	60	
<b>Liofilización del sobrenadante de cultivo</b>		
LACp	3	6
LiPp	3	
<b>Emulsión al 95 % CXP</b>		
Emulsión	2	2

(Continuación: Tabla N° 4. Cantidad total de pruebas aplicadas al proceso de biomejoramiento del CXP campo Carabobo)

<b>Tratamiento enzimático del CXP</b>			
<b>LACp</b>	10 h	2	7
	20 h	2	
	30 h	2	
	Control	1	
<b>LiPp</b>	10 h	2	7
	20 h	2	
	30 h	2	
	Control	1	
<b>Rompimiento de las emulsiones en cada uno de los tratamientos</b>			
<b>LACp</b>	7		14
<b>LiPp</b>	7		
<b>Determinación de las propiedades físico-químicas de las muestras de CXP</b>			
<b>Análisis de Gravedad API</b>			
<b>LACp</b>	10 h	5	20
	20 h	5	
	30 h	5	
	Control	5	
<b>LiPp</b>	10 h	5	20
	20 h	5	
	30 h	5	
	Control	5	

(Continuación: Tabla N° 4. Cantidad total de pruebas aplicadas al proceso de biomejoramiento del CXP campo Carabobo)

<b>Análisis SARA</b>			
<b>Precipitación de asfaltenos</b>			
<b>LACp</b>	10 h	2	8
	20 h	2	
	30 h	2	
	Control	2	
<b>LiPp</b>	10 h	2	8
	20 h	2	
	30 h	2	
	Control	2	
<b>Cromatografía de Adsorción</b>			
<b>LACp</b>	10 h	4	16
	20 h	4	
	30 h	4	
	Control	4	
<b>LiPp</b>	10 h	4	16
	20 h	4	
	30 h	4	
	Control	4	
<b>Destilación Simulada</b>			
<b>LACp</b>	20 h	1	2
	Control	1	
<b>LiPp</b>	20 h	1	2
	Control	1	

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos y su análisis luego de aplicar la metodología descrita en el capítulo anterior, la cual, permitió cumplir con los objetivos propuestos en este Trabajo Especial de Grado.

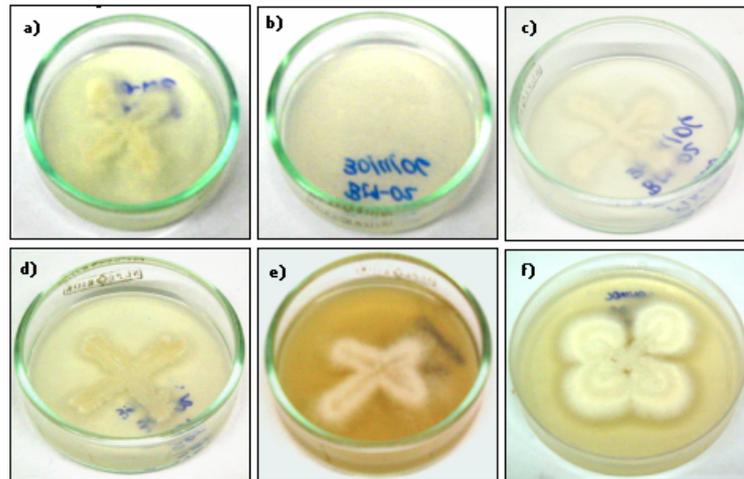
#### ***Caracterización fenotípica de las cepas fúngicas seleccionadas***

La caracterización fenotípica de los hongos filamentosos se llevó a cabo tomando en cuenta dos aspectos importantes: a) la capacidad de crecimiento de las cepas fúngicas en medio mínimo Cz suplementado con diversos HPAs como única fuente de carbono y energía y; b) la capacidad de la producción de EOE de estos hongos mediante la oxidación del sustrato (ABTS) en placas de cultivo.

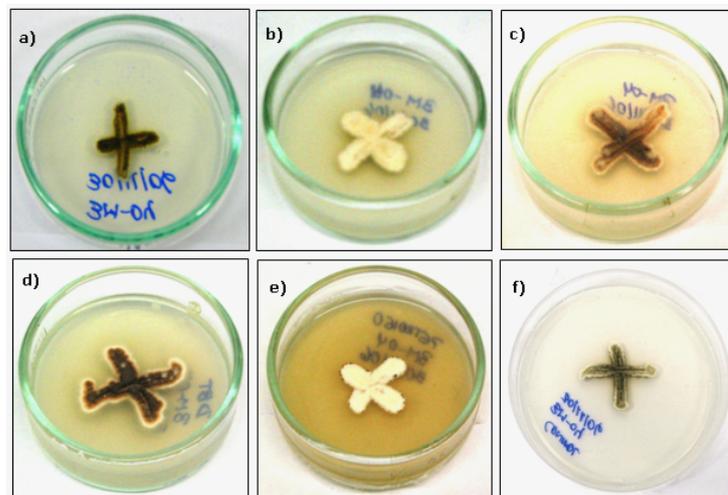
##### ***a) Crecimiento de los hongos filamentosos usando HPAs o CXP como únicas fuentes de carbono y energía.***

Los resultados revelaron que la cepa BM-02 (fig. 25) es capaz de crecer en medio mínimo Cz suplementado con sacarosa (control positivo), naftaleno, DBT, pireno y CXP como únicas fuentes de carbono y energía. No obstante, esta cepa fue incapaz de crecer utilizando fenantreno. En general, esta cepa mostró una mayor velocidad de crecimiento utilizando sacarosa como fuente de carbono y energía en comparación con los HPAs empleados como fuente de carbono. En el caso de la cepa BM-04, los resultados mostraron (fig. 26) que esta cepa es capaz de crecer en medio mínimo Cz suplementado con sacarosa (control positivo), naftaleno, fenantreno, pireno, DBT y CXP como únicas fuentes de carbono y energía. A su vez, la cepa BM-04 mostró la

menor velocidad de crecimiento en todas las condiciones empleadas en comparación con las otras cepas estudiadas.

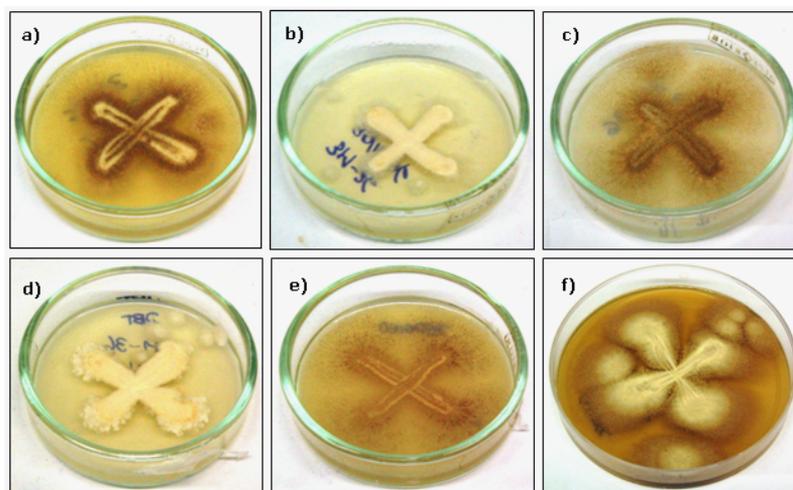


**Figura 25.** Crecimiento del hongo BM-02 a los 14 d en medio mínimo Cz suplementado con: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno, d) DBT, e) CXP, y e) sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.



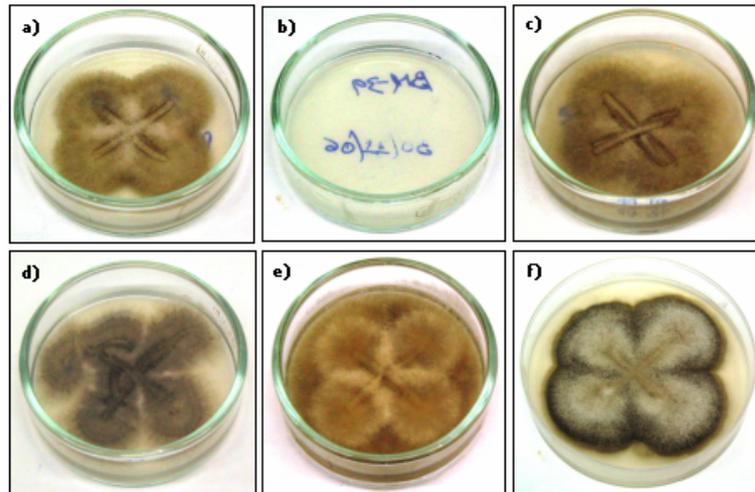
**Figura 26.** Crecimiento del hongo BM-04 a los 14 d en medio mínimo Cz suplementado con: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno, d) DBT, e) CXP y f) sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

Con relación a la cepa BM-36 (fig. 27), los resultados mostraron que es capaz de crecer en medio mínimo Cz suplementado con naftaleno, fenantreno, pireno, DBT, CXP y sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía. En general, esta cepa mostró una mayor velocidad de crecimiento utilizando sacarosa como fuente de carbono y energía en comparación con los HPAs empleados como fuente de carbono.



**Figura 27.** Crecimiento del hongo BM-36 a los 14 d en medio mínimo Cz suplementado con: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno, d) DBT, e) CXP y f) sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

Los resultados obtenidos con la cepa fúngica BM-39 (fig. 28) mostraron su alta capacidad de crecimiento en medio mínimo Cz suplementado con naftaleno, pireno, DBT, CXP y sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía. Sin embargo, esta cepa, al igual que el hongo BM-02, es incapaz de crecer utilizando fenantreno como única fuente de carbono y energía.



**Figura 28.** Crecimiento del hongo BM-39 a los 14 d en medio mínimo Cz suplementado con: a) naftaleno, b) fenantreno, c) pireno y d) DBT, así como, e) CXP y f) sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.

De manera general, los resultados mostraron que la velocidad de crecimiento de todas las cepas fúngicas empleadas fue elevada durante los primeros 7 d. A partir de ese tiempo se observó una etapa cuasi-estacionaria con variaciones en el crecimiento poco significativas. Las cepas fueron evaluadas en base a la escala de crecimiento y los resultados de esta evaluación se muestran en la tabla N° 5.

**Tabla N° 5.** Crecimiento de los hongos en medio de cultivo suplementado con diferentes HPAs, CXP y sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

Cepa	Medio de cultivo Cz suplementado					
	NAF	FEN	PIR	DBT	CXP	SAC
BM-02	++	-	++	++	++	++
BM-04	+	+	+	+	+	+
BM-36	++	++	++	++	++	+++
BM-39	++	-	+++	+++	+++	+++

NAF: Naftaleno, FEN: Fenantreno, PIR: Pireno y SAC: Sacarosa

(-) sin crecimiento, (+) bajo crecimiento, (++) moderado crecimiento y (+++) buen crecimiento

De acuerdo a estos resultados (tabla 5), se clasifica el hongo filamentoso BM-39 como una cepa de buen crecimiento, ya que mostró la mayor velocidad de crecimiento con relación al resto de las cepas estudiadas. No obstante, esta cepa es incapaz de utilizar fenantreno como única fuente de carbono y energía. Los hongos BM-02 y BM-36 se clasifican como hongos de crecimiento moderado, ya que mostraron una menor velocidad de crecimiento en comparación a la cepa anterior. Por otra parte, el hongo BM-04, al mostrar la menor velocidad de crecimiento, se clasifica como una cepa de bajo crecimiento.

Sin embargo, es importante destacar que algunos estudios indican que la baja tasa de crecimiento de un hongo en medio de cultivo sólido suplementado con diversos HPAs como únicas fuentes de carbono y energía, no implica necesariamente que posean una baja capacidad de degradar otros hidrocarburos complejos presentes en el crudo (Kapoor y col., 1978; Chaillan y col., 2004; Saparrat y Hammer, 2006).

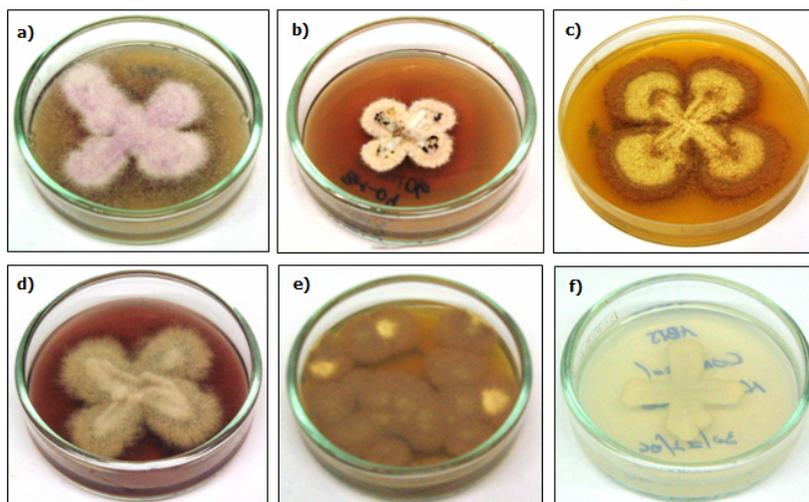
**b) Producción de EOE por los hongos filamentosos mediante ensayo colorimétrico con ABTS.**

La capacidad de las cepas fúngicas para producir EOE fue medida cualitativamente a partir de la actividad oxidativa extracelular de ABTS. Tal como se describe en la metodología, esta actividad se determinó por la intensidad del color en el medio de cultivo Kirk en un período de tiempo de 7 a 21 d. Para este ensayo, fueron empleadas las cepas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Saccharomyces cerevisiae* como control positivo y negativo respectivamente.

De forma interesante los resultados revelaron la presencia de EOE en todas las cepas analizadas (fig. 29).

Los hongos fueron clasificados de acuerdo a la escala colorimétrica citada en el procedimiento experimental en:

- i) *Sin coloración (-)*, cepas que no presentan actividad oxidativa extracelular de ABTS: solo se observó un medio sin color con la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, usado como el control negativo, tal como lo reportaron Naranjo y col., (2007).
- ii) *Intensidad de color baja (+)*, cepas que presentan una baja actividad oxidativa extracelular de ABTS: en este caso se encuentra el hongo BM-02, donde se observó poca coloración en el medio de cultivo.
- iii) *Intensidad de color moderada (++)*, cepas que presentan una moderada actividad oxidativa extracelular de ABTS: no se observó en ninguna de las cepas.
- iv) *Coloración elevada (+++)*, cepas con alta actividad oxidativa extracelular de ABTS: en este caso se encuentran las cepas BM-04, BM-36 y BM-39, las cuales, conforman el grupo con la mayor actividad productiva de EOE.



**Figura 29.** Ensayo colorimétrico con ABTS para detectar cualitativamente la producción de EOE de los hongos: a) BM-02, b) BM-04, c) BM-36, d) BM-39, e) control positivo; y f) control negativo.

Este último grupo de hongos mostraron niveles similares de actividad oxidativa extracelular de ABTS comparados con la actividad oxidativa del hongo de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*, perteneciente al grupo basidiomycetes (hongos con un alto poder ligninolítico) (Peláez, Martínez y Martínez, 1995). Los basidiomycetes poseen una gran capacidad para producir enzimas EOE, las cuales, están asociadas a procesos degradativos de diversos compuestos recalcitrantes de origen natural (entre ellos la lignina), y xenobióticos (fenoles clorados, HPAs, etc.) (Saparrat, 2000).

Estos resultados sugieren que el hongo BM-04, a pesar de haber mostrado la menor velocidad de crecimiento en medio mínimo Cz suplementado con diversos HPAs y CXP, por medio de este Test colorimétrico, resultó ser una de las cepas mayores productoras de EOE. De igual forma, es importante señalar que la ausencia y/o la baja actividad oxidativa extracelular de ABTS no implica necesariamente la incapacidad para producir EOE, sin embargo, puede reflejar una posible inhibición de su expresión (Saparrat, 2000).

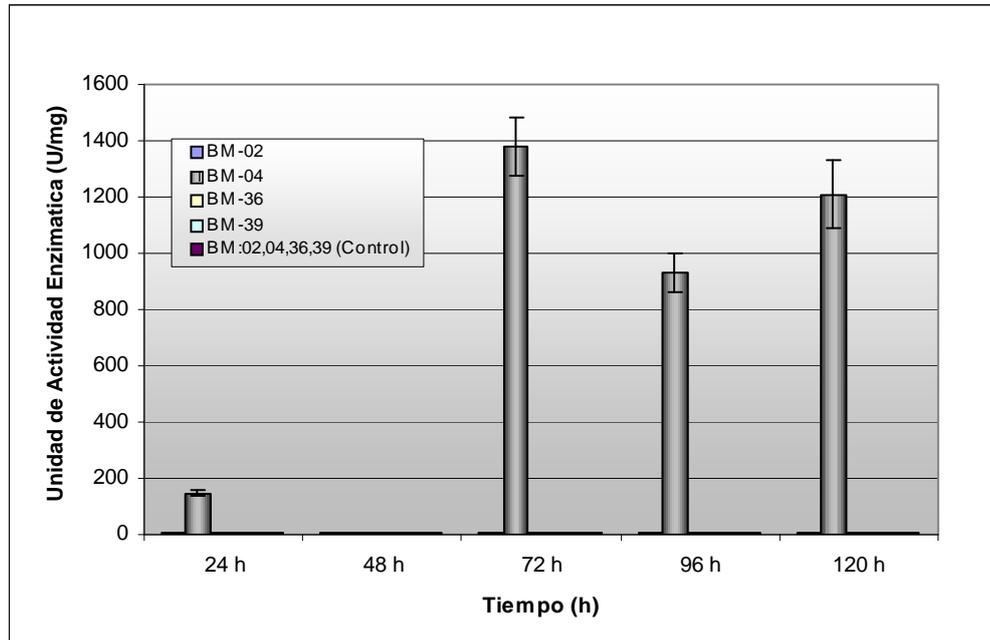
Estos ensayos representan un paso importante para seleccionar cepas fúngicas con alto valor para ser utilizadas en el desarrollo de nuevas tecnologías limpias. Por otra parte, es importante señalar, que este tipo de ensayo permite de forma adecuada y sencilla la búsqueda de hongos filamentosos autóctonos con capacidad para producir EOE y, por consiguiente, con potencial para ser utilizados como biocatalizadores en procesos de conversión enzimática parcial y, en procesos de biorremediación.

### **Producción específica de enzimas oxidativas extracelulares del sistema enzimático extracelular de degradación de lignina (SEDL)**

En los estudios fenotípicos anteriores se demostró la capacidad de las cepas fúngicas seleccionadas de catabolizar diversos HPAs, CXP, así como, la capacidad de producir EOE. Particularmente, las cepas BM-04, BM-36 y BM-39 revelaron un alto potencial ligninolítico. Tomando en cuenta lo anterior, se plantea la siguiente hipótesis: *Sí* las cepas BM-04, BM-36 y BM-39 contienen el SEDL y este está implicado en la bioconversión de CXP, *entonces*, la adición de CXP como única fuente de carbono y energía en caldos de cultivo debería inducir las actividades de las EOE (Naranjo y col., 2007). Por otra parte, al ser el afrecho un sustrato ligninolítico, su empleo en caldos de cultivo como única fuente de carbono y energía, debería, al igual que el CXP, inducir el SEDL.

A fines de confirmar esta hipótesis, se midieron las actividades específicas del SEDL (LACp, LIPp y MnPp) en medio de cultivo líquido Cx utilizando afrecho o CXP como únicas fuentes de carbono y energía. Las cepas crecieron como se describió en la metodología.

Los resultados mostraron, en todos los casos, que las actividades LACp, LIPp y MnPp no fueron inducidas cuando se empleó sacarosa (control positivo) como única fuente de carbono (fig. 30).

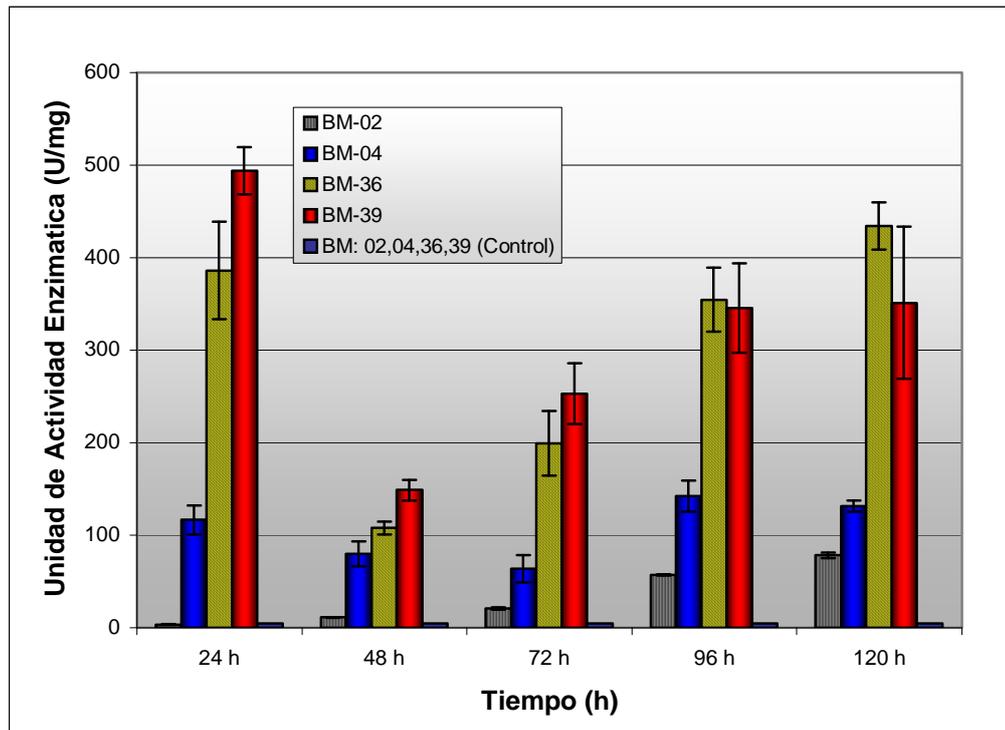


**Figura 30.** Actividad enzimática LACp de la cepa BM-04 en medio mínimo suplementado con afrecho o sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

### *Inducción de la actividad LACp*

Los resultados mostraron que la actividad LACp fue inducida única y poderosamente en la cepa BM-04 utilizando afrecho como única fuente de carbono y energía, tal como se observa en la figura 30. En esta condición la actividad LACp alcanzó el máximo nivel de actividad (1379 U/mg) a las 72 h de incubación (ver anexos). Luego, se observa una disminución de la actividad LACp de 72 a 96 h. Finalmente, se observa un aumento de la actividad de esta enzima a las 120 h a un nivel superior próximo a 120,9 veces comparada al control (ver anexo 1). Es importante señalar que a las 48 h de incubación no fue detectado ningún nivel de actividad en este medio de cultivo, lo cual, pudo ser ocasionado por desactivación de la enzima debido a daños en la muestra.

En comparación con estos resultados, la actividad de la LACp fue inducida en niveles mas bajos en cada una de las cepas utilizando CXP como única fuente de carbono y energía (fig. 31).



**Figura 31.** Actividad enzimática LACp de las cepas BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en medio mínimo suplementado con CXP o sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

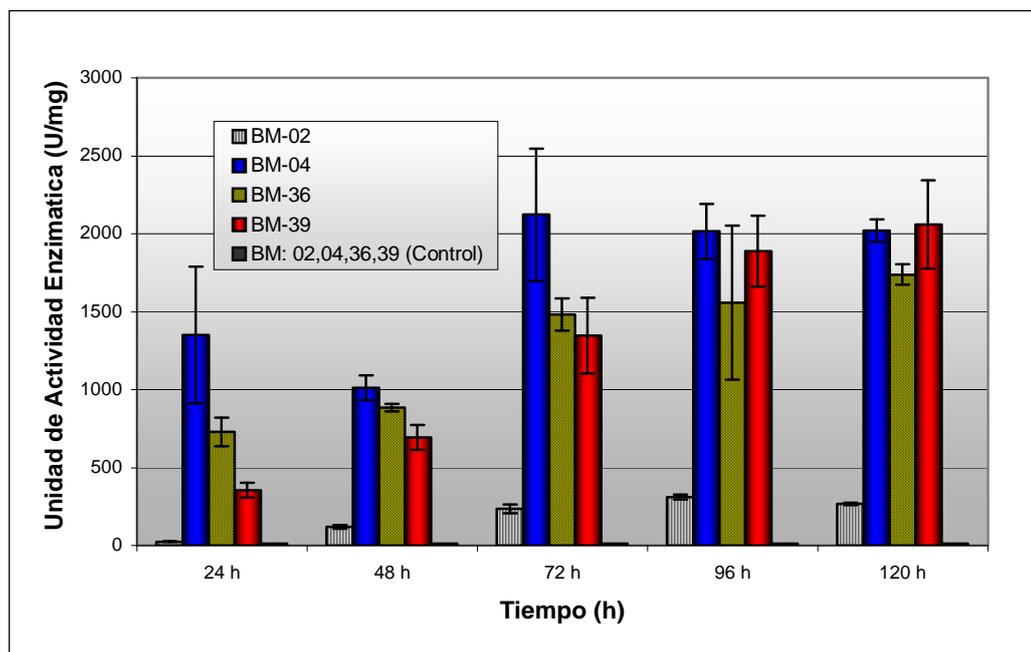
En esta condición la actividad LACp para las cepas BM-04, BM-36 y BM-39 aumentaron hasta las 24 h a niveles superiores próximos a 116,5, 386,1 y 493,9 veces respectivamente comparadas con el control (ver anexo 1). Luego se observó una disminución de LACp en todas las cepas hasta las 48 h pero mostrando siempre niveles significativos más altos relativos al control. A partir de las 48 h y hasta las 120 h se observó un incremento paulatino de la actividad en todas las cepas, a niveles siempre superiores al del control. Los resultados mostraron que a las 96 h se alcanzó

el máximo nivel de actividad para la cepa BM-04 (142,2 U/mg) y, a las 120 h se alcanzó el nivel máximo de esta actividad para las cepas BM-02 (78,27 U/mg) y BM-36 (351,3 U/mg) (ver anexo 1). Es importante señalar que la cepa BM-02 mostró bajos niveles de actividad de LACp en comparación al de las otras cepas, debido a que estos sustratos empleados no logran inducir fuertemente las actividades de sus EOE (ver anexos).

Por otra parte, la producción enzimática depende entre otros factores de la presencia de un inductor (Gianfreda y col., 1999). En el caso de la actividad LACp, los principales inductores incluyen compuestos fenólicos relacionados a la lignina, compuestos no derivados de la lignina y diferentes extractos vegetales de diversa naturaleza que han demostrado ser buenos inductores (Salas y col., 1995). De acuerdo a los resultados obtenidos, el afrecho (fuente proteica de origen vegetal) podría haber permitido que el hongo BM-04 respondiera a una señal de reconocimiento conduciendo a una intensiva respuesta biológica que activó, aún más, su metabolismo y mejoró la producción de esta enzima ligninolítica.

### ***Inducción de la actividad LiPp***

La actividad LiPp no se detectó en ninguna de las cepas estudiadas en medio mínimo suplementado con afrecho o con sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía. Solamente la actividad de LiPp fue inducida empleando CXP como única fuente de carbono y energía (fig. 32).



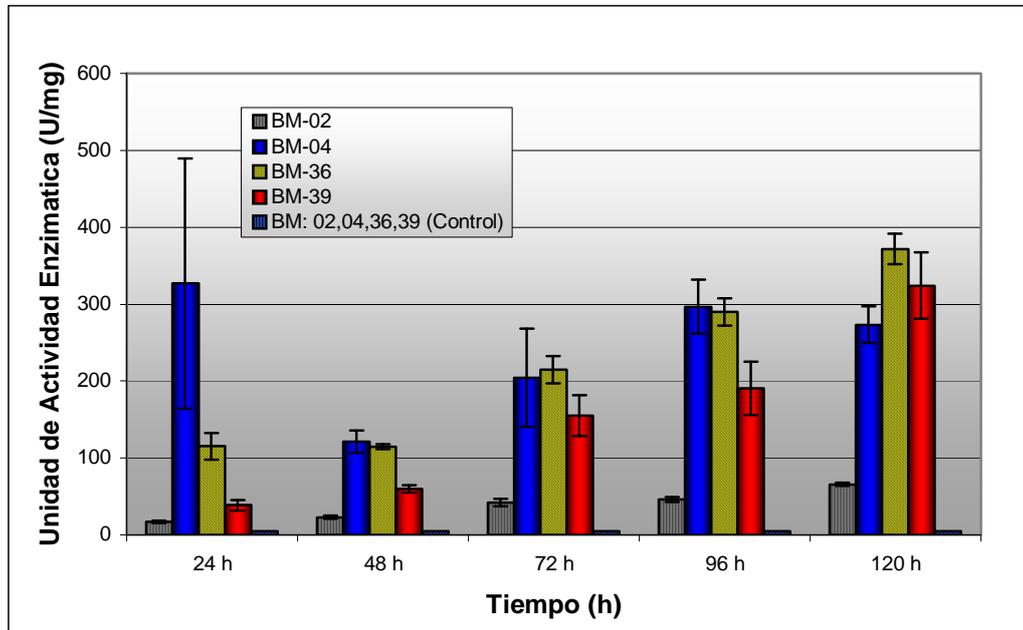
**Figura 32.** Actividad enzimática LiPp de las cepas BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en medio mínimo suplementado con CXP o sacarosa (control) como únicas fuentes de carbono y energía.

En esta condición, las actividades LACp, LiPp y MnPp aumentaron en general de 24-120 h. La actividad LiPp en las cepas BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 mostraron niveles máximos de inducción próximos a 311,9 (96 h), 2122,4 (72 h), 1739 (120 h) y 2060,5 (120 h) respectivamente (ver anexo 1). Particularmente, la cepa BM-04 presentó la mayor inducción de LiPp en los diferentes tiempos de incubación. Por el contrario, y como en el caso de actividad LACp, la cepa BM-02 presentó la menor actividad LiPp con relación al resto de las cepas estudiadas.

### ***Inducción de la actividad MnPp***

La actividad MnPp no se detectó para ninguna de las cepas estudiadas en medio mínimo suplementado con afrecho o con sacarosa (control positivo) como únicas

fuentes de carbono y energía. Solamente la actividad MnPp fue inducida cuando CXP fue utilizado como única fuente de carbono y energía (fig. 33).



**Figura 33.** Actividad enzimática MnPp de las cepas BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 en medio mínimo suplementado con CXP o sacarosa (control positivo) como únicas fuentes de carbono y energía.

En general, todas las cepas mostraron un aumento en la actividad MnPp entre las 24-120 h de incubación. Sólo la cepa BM-04 presentó un nivel máximo de actividad a las 24 h de 326,9 veces comparado al control (fig. 33). La actividad MnPp fue inducida en mayor proporción en las cepas BM-04, BM-36 y BM-39, alcanzando, en éstas dos últimas, niveles máximos próximos a 371,9 y 324,2 U/mg veces respectivamente a las 120 h (ver anexo 1). En el caso de la cepa BM-02 se encontraron los niveles más bajos de actividad MnPp en el lapso de tiempo estudiado.

De acuerdo con estos resultados, posiblemente las actividades EOE de la mayoría de las cepas fúngicas fueron inducidas por la naturaleza compleja de los CXP (Naranjo y col., 2007). La bioconversión de compuestos de naturaleza compleja, tales como la

lignina y el petróleo, requiere en conjunto una gran cantidad y diversidad de EOE, así como también un sustrato de amplia especificidad. Por lo tanto, es posible que la inducción de las actividades de EOE sea directamente proporcional a la complejidad del sustrato (Naranjo y col., 2007).

De este modo, los resultados obtenidos sugieren poderosamente que: i) las cepas BM-02, BM-04, BM-36 y BM-39 son capaces de sintetizar EOE; ii) las actividades de EOE (en el caso de las cepas BM-04, BM-36 y BM-39) son inducidas fuertemente por CXP y posiblemente están implicadas en la bioconversión del CXP; iii) la actividad de la LACp del género BM-04 es inducida fuertemente por el afrecho; y finalmente iv) los resultados anteriores hacen suponer que existe una relación entre el SEDL y la bioconversión del CXP.

Finalmente, debido a la baja inducción de EOE que mostró la cepa BM-02, fueron seleccionadas las cepas BM-04, BM-36 y BM-39 para llevar a cabo el tratamiento enzimático del CXP. Por otra parte, fueron seleccionadas las actividades LiPp y LACp para realizar el biotratamiento del CXP, ya que la actividad MnPp fue inducida en menor proporción en todas las cepas estudiadas.

### ***Efecto del biotratamiento en las propiedades físico-químicas del CXP***

Los resultados del estudio realizado sobre la composición y las propiedades físico-químicas del crudo campo Carabobo se presentan a continuación:

#### ***Rompimiento de las emulsiones***

La ruptura de las emulsiones del biotratamiento con la mezcla de LACp y LiPp se llevó a cabo aplicando un tratamiento térmico (150-200 °C) en reactores sellados. El agua de rompimiento proveniente de cada tratamiento (25 mL de buffer) fue

recuperada totalmente, así como también fueron recuperadas las sales que contenía el buffer (fig. 34). De este modo, al poder recuperar parte de los reactivos necesarios para llevar a cabo el proceso, los costos del mismo disminuyen haciéndolo más atractivo comercialmente.



**Figura 34.** Cristales de sal del buffer recuperados en el agua de rompimiento del tratamiento con la mezcla de LiPp (50X de aumento).

Durante el rompimiento de las emulsiones en los tratamientos con la LACp y la LiPp, se observó que la solución acuosa (agua de rompimiento) proveniente del tratamiento con la mezcla de LiPp era de color amarillento, similar al color del buffer tartrato de sodio. En el caso del tratamiento con la mezcla de LACp, la fase acuosa era de color marrón el cual presentó la mayor intensidad a las 20 h de tratamiento (ver anexo 2). Esto sugiere la formación de una emulsión más estable conformada por finas gotas de crudo (tamaño de gota  $< 1 \mu\text{m}$ ). Las reacciones de oxidación que catalizan las enzimas en este tipo de sistema, se llevan a cabo en la interfase crudo-agua.

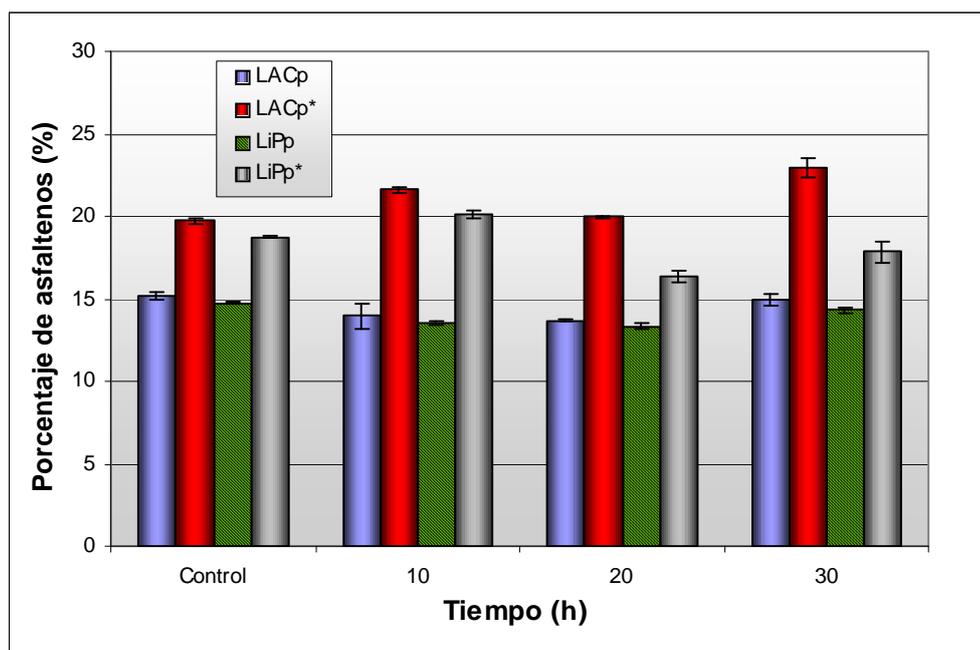
En la superficie de las gotas de crudo se encuentran las grandes moléculas de asfaltenos, las cuales son las moléculas de mayor polaridad en el CXP y los productos son moléculas oxidadas y craqueadas que permanecen en la interfase. Algunos de estos productos de oxidación podrían ser moléculas con actividad interfacial las cuales podrían proporcionar una estabilidad adicional a las gotas de crudo más pequeñas minimizando su proceso de coalescencia durante el rompimiento de la

emulsión. Por tal razón, estos resultados sugieren de forma cualitativa que la mezcla de LACp podría tener el mayor potencial de bioconversión del CXP.

### Composición del Crudo: Análisis SARA

#### a) Conversión de Asfaltenos

Los resultados obtenidos en la conversión de asfaltenos de la muestra de crudo biotratado (fig. 35) muestran la variación en este porcentaje antes y después de aplicar el tratamiento térmico a temperatura 350 °C.



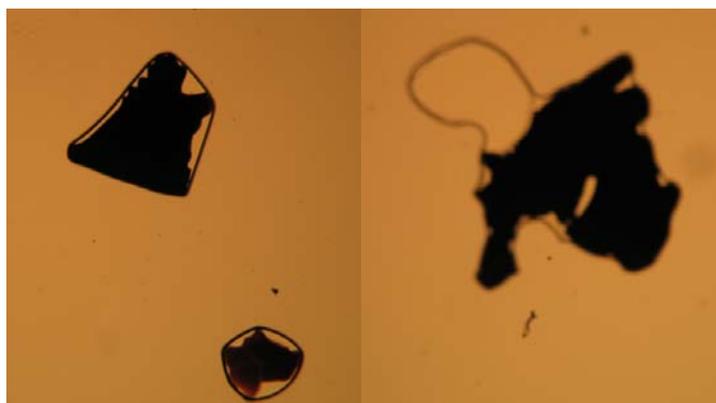
\*Muestras de crudo sometidas a tratamiento térmico (350 °C)

**Figura 35.** Porcentaje de asfaltenos contenido en las muestras de crudo biotratadas con la mezcla de enzimas LACp y LiPp.

Los resultados obtenidos a las 10 y 20 h de tratamiento con la mezcla de LACp y LiPp (sin tratamiento térmico) mostraron una conversión de asfaltenos mayor al 1%

con respecto al control (ver anexo 4), indicando de este modo, un ligero mejoramiento en la muestra de crudo. Los resultados obtenidos a las 30 h de tratamiento mostraron una conversión menos significativa con respecto al control de 0,41 % en el caso del tratamiento con la LiPp y 0,2 % en el caso del tratamiento con la LACp. Al aplicar el tratamiento térmico, el contenido de asfaltenos aumentó considerablemente en la mayoría de las muestras (fig. 35) y sólo en el tratamiento correspondiente a las 20 h con la mezcla de LiPp el contenido de asfaltenos bajó. En este caso la conversión de asfaltenos fue superior al 2 % con respecto al control. En el tratamiento con la mezcla de LACp se observó de forma general una conversión negativa de asfaltenos con respecto al control, reportándose el menor de estos porcentajes a las 20 h de tratamiento (-0,23 %). Problemas de sobrecalentamiento de los reactores y pérdidas de combustibles durante el tratamiento térmico, pudieron haber sido las causas que originaron la producción de asfaltenos.

En efecto, con la ayuda del microscopio óptico se observaron partículas de coque en la muestra de asfaltenos (fig. 36), las cuales representaron aproximadamente un 4 % de la fracción total.



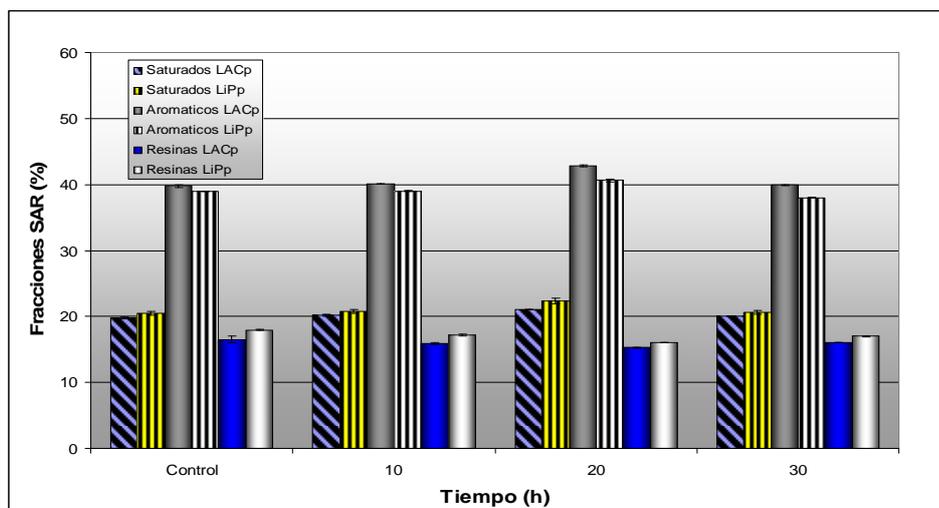
**Figura 36.** Partículas de coque presentes en una muestra de crudo tratada durante 20 h con la mezcla de LACp (100X de aumento)

De este modo, el desmejoramiento de la fracción asfáltica se debió principalmente a la producción de grandes moléculas como el coque y a las pérdidas de combustibles por sobrecalentamiento.

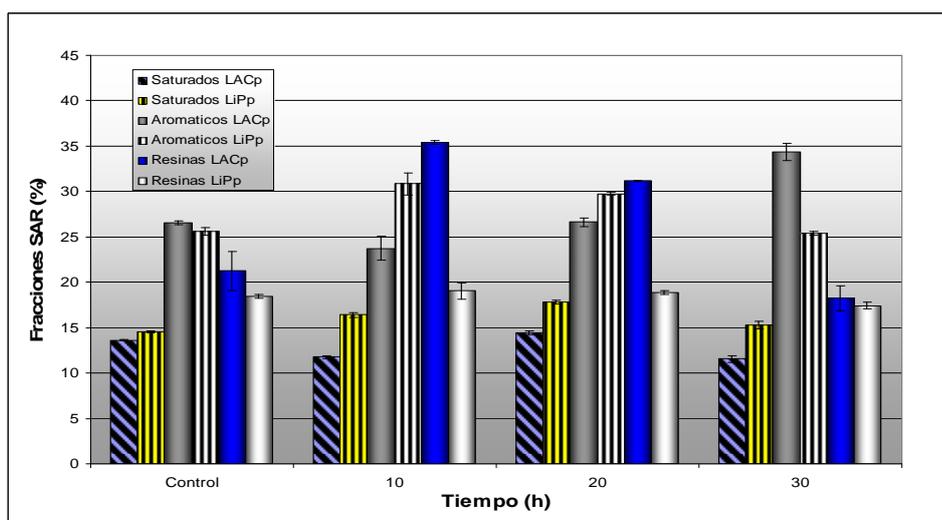
Existe la posibilidad que las enzimas se desnaturalicen (pérdida de actividad) en un lapso de tiempo superior a las 24 h, y por tanto no produzcan un cambio en el crudo, tal como se observó a las 30 h de tratamiento (muestras sin tratamiento térmico). Estos resultados sugieren que, de ser posible el biomejoramiento del CXP se debería entre otras cosas, incrementar la cantidad de enzima empleada en el ensayo, ya que, a una cierta concentración de CXP (sustrato) todos los sitios activos de la enzima están ocupados, por lo tanto, todas las demás moléculas del sustrato deben esperar hasta que se encuentre libre uno de estos sitios antes de que ellas puedan entrar, en cambio, si se aumenta el contenido de enzimas existirán más sitios activos disponibles que reaccionarán con las moléculas de sustrato tan rápido como entran en este (Sánchez, 2002). Con ello se podría lograr la oxidación de una mayor cantidad de compuestos pesados, aumentando significativamente la conversión de asfaltenos y optimizando el tiempo del biotratamiento.

*b) Cromatografía de Adsorción de los maltenos (Saturados, Aromáticos y Resinas)*

El fraccionamiento de los maltenos se realizó por cromatografía de adsorción utilizando alúmina de grado cromatográfico (tal como se describió en el procedimiento experimental), en una relación soporte-muestra de 60:1. Relaciones similares a la de este ensayo han sido utilizadas previamente con resultados muy satisfactorios en este tipo de análisis, donde no se requiere de un alto grado de precisión (Layrisse y col., 1984). Los resultados obtenidos en la cromatografía de adsorción (figuras 37 y 38) muestran la variación en la composición de las muestras de crudo biotratadas con y sin tratamiento térmico a temperatura de 350 °C.



**Figura 37.** Porcentajes de Saturados, Aromáticos y Resinas (SAR) de las muestras de crudo sin tratamiento térmico obtenidos mediante la cromatografía de adsorción



**Figura 38.** Porcentajes de Saturados, Aromáticos y Resinas (SAR) obtenidos mediante la cromatografía de adsorción de las muestras de crudo biotratadas sometidas a tratamiento térmico

Los porcentajes de las fracciones de saturados obtenidos a partir de este ensayo para las muestras de crudo tratadas con las mezclas de LACp y LiPp (fig. 37) fue elevado en comparación con las encontradas en la composición típica reportada en la

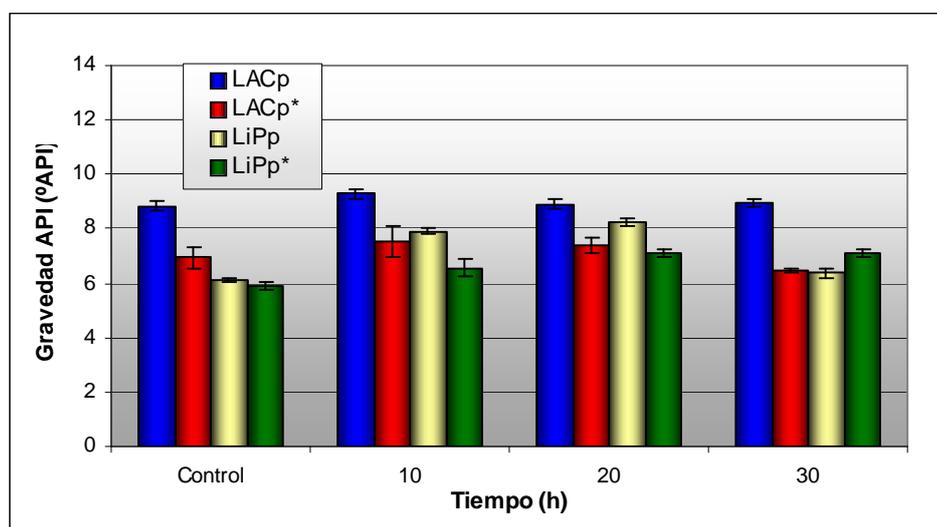
literatura (Hernández, Jelambi y Requena, 2001) para varios crudos pesados y residuales venezolanos (ver anexo 4). La disminución del porcentaje de saturados en las muestras de crudo sometidas a tratamiento térmico (fig. 38) pudo ser ocasionada por pérdidas de los destilados más ligeros debido al sobrecalentamiento de los reactores.

Los resultados de la cromatografía de adsorción obtenidos de las muestras de crudo biotratadas y sometidas a tratamiento térmico mostraron en general una disminución del porcentaje de las fracciones más livianas (saturados y aromáticos) y un aumento de la fracción más pesada (resinas), siendo más significativo este incremento en las muestras tratadas con la mezcla de LACp (fig. 38). Esto pudo ser ocasionado por la conversión de los compuestos aromáticos durante el tratamiento térmico, ya que, debido al sobrecalentamiento de los reactores pudieron craquearse estas moléculas generándose así radicales libres que a su vez se unieron y formaron moléculas de mayor tamaño, desmejorando así la composición de la muestra de crudo. En general, los resultados obtenidos en la cromatografía de adsorción en cada uno de los períodos de tratamiento para las muestras tratadas con ambas mezclas enzimáticas, muestran variaciones poco significativas con respecto al control. Estos resultados pueden ser ocasionados por varios factores, entre los cuales se pueden mencionar: i) bajo potencial de bioconversión de estas especies sobre los compuestos presentes en la parte más pesada del CXP; y/o ii) poca precisión de estos métodos para detectar los ligeros cambios producidos en cada una de las fracciones presentes en las muestras de crudo.

### ***Gravedad API***

La gravedad API se determinó a partir del método de flotabilidad del crudo en una solución salina de concentración conocida (tal como fue descrito en el procedimiento

experimental). Los resultados se clasifican entre las muestras de crudo tratadas térmicamente y las que no recibieron este tratamiento (fig. 39).



\*Muestras de crudo sometidas a tratamiento termico

**Figura 39.** Gravedad API de las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LACp y LiPp (con y sin tratamiento térmico)

Los resultados obtenidos a partir de las muestras de crudo tratadas con la mezcla de la LACp (sin tratamiento térmico) no muestran una diferencia apreciable de la densidad (expresada en °API) con respecto al control (fig. 39), manteniéndose este valor alrededor de los 9 °API. Por el contrario, en el tratamiento con la mezcla de la LiPp se observa una diferencia apreciable de aproximadamente 2 °API (ver anexo 3), entre las muestras de crudo tratadas (10 y 20 h) y el control, disminuyendo esta diferencia a las 30 h, debido a la desactivación catalítica de la mezcla de enzimas. Es importante señalar, que en ninguno de los tratamientos se pudo obtener un crudo con una gravedad API superior a los 10 °API, lo cual significa que el tratamiento enzimático aplicado bajo las condiciones operacionales del ensayo (cantidad de enzima, presión 1 atm, temperatura de 30 °C y en atmósfera de aire) no permitió la bioconversión del CXP a un crudo pesado.

En las muestras de crudo sometidas a tratamiento térmico (LACp\* y LiPp\*) se observó en general un valor de gravedad API inferior a 8 °API (fig, 39). Durante las 10 y 20 h de tratamiento se encuentran en general los valores más elevados de gravedad API en cada tratamiento. Como se indicó anteriormente, el tratamiento térmico no pudo ser controlado adecuadamente, por lo que pudieron formarse moléculas más pesadas, y/o producirse la separación de compuestos más livianos de la muestra de crudo, o ambos fenómenos al mismo tiempo, lo cual hace más pesada la muestra de crudo tratada y por ende con un bajo valor de gravedad API. Es importante señalar, que en el tiempo de estudio, los resultados obtenidos en ambos tratamientos no presentan una diferencia significativa con respecto al control ( $< 1$  °API) (ver anexos). Esto sugiere que el biomejoramiento de las muestras es muy leve, y resulta difícil de detectar en las muestras de crudo algún cambio de gravedad API a partir de este método.

### ***Destilación Simulada***

El análisis de destilación simulada (Norma ASTM D-7169-05) fue aplicado a las muestras de crudo biotratadas durante 20 h y sometidas a tratamiento térmico. Se seleccionaron estas muestras, ya que, durante este lapso de tiempo se observaron los cambios más importantes en las propiedades de las muestras de crudo biotratadas (ligero aumento de la gravedad API y mayor conversión de asfaltenos en el caso de la LiPp). Por otra parte, al someter estas muestras a un tratamiento térmico se debilitan y rompen los enlaces internos C-C presentes en las grandes moléculas y los enlaces C-O formados por la oxidación enzimática, generándose moléculas de menor peso molecular y por tanto se logra un mejoramiento de la composición de la muestra de crudo. De este modo, se puede facilitar la detección de cualquier cambio ligero en las fracciones más pesadas por medio de este tipo de análisis. Los resultados obtenidos con el método de destilación simulada, mostraron que a partir del tratamiento con la mezcla de LACp se logró la bioconversión de la muestra de CXP, obteniéndose una

conversión del residuo 500 °C+ entre 2-10 % con respecto al control (tabla N° 6). Así mismo, la fracción de gasóleo de vacío aumentó significativamente (5-15 %). Sin embargo, se observó una disminución en la fracción de diesel (ver anexo 5). En esta muestra al igual que en el control no se obtuvieron fracciones de nafta y jet fuel (tabla N° 7).

**Tabla N° 6.** Porcentaje de conversión del residuo 500 °C+ de las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LACp y LiPp

Tratamiento con la mezcla de LACp y LiPp		
Corte	Conversión (%)	
	LACp	LiPp
Residuo 500 °C+	2 - 10	(-2) – (-10)

**Tabla N° 7.** Análisis de destilación simulada aplicado a las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LACp.

Tratamiento con la mezcla de LACp		
Corte	Temperatura de ebullición (°C)	Producción de combustibles (%)
Nafta	IBP*-200	-
Jet fuel	200-250	-
Diesel	250-350	-
Gasóleo de vacío	350-500	5 - 15

\*IBP: Initial Boiling Point

La disminución de la fracción de diesel en la muestra de crudo biotratada demostró que durante el tratamiento térmico parte de los destilados se escaparon del reactor debido al sobrecalentamiento. Sin embargo, a pesar de estas valiosas pérdidas, la ganancia total de combustibles (fuel gain) a partir del tratamiento enzimático con LACp se encuentra en un rango de 2- 10 % (datos no mostrados), lo cual demuestra el potencial de bioconversión que posee esta enzima sobre el CXP, ya que logró transformar el corte de moléculas pesadas en fracciones más ligeras, bajo las condiciones suaves de operación (presión y temperatura) a las cuales se llevó a cabo el biotratamiento.

La muestra tratada con la mezcla de LiPp presentó una conversión negativa del residuo 500 °C+ con respecto al control (ver anexo 5), esto significa que en lugar de disminuir se produjo una mayor cantidad de moléculas pesadas. Sin embargo, en comparación con la muestra tratada con la mezcla de LACp, se observó una conversión del gasóleo de vacío en diesel y jet fuel (tabla N° 8), destacándose que el jet fuel sólo fue producido a partir de esta muestra.

**Tabla N° 8.** Análisis de destilación simulada aplicado a las muestras de crudo tratadas con la mezcla de LiPp.

<b>Tratamiento con la mezcla de LiPp</b>		
<b>Corte</b>	<b>Temperatura de ebullición (°C)</b>	<b>Producción de combustibles (%)</b>
<b>Nafta</b>	IBP*-200	-
<b>Jet fuel</b>	200-250	1 - 5
<b>Diesel</b>	250-350	5 - 15

\*IBP: Initial Boiling Point

Estos resultados indican que la mezcla de LiPp no es capaz de convertir la fracción del residuo 500 °C+ de la muestra de CXP, sin embargo, convierte la segunda fracción más pesada correspondiente al gasóleo de vacío en cortes más livianos como el diesel (5-15 %) y jet fuel (1-5 %). Esto sugiere que la mezcla de LiPp presentan cierta selectividad hacia moléculas presentes en el gasóleo de vacío las cuales son de menor polaridad y complejidad que las existentes en el residuo 500 °C+. Estas enzimas promueven la conversión de estas moléculas en otras más sencillas y a su vez promueven la unión de algunos productos de oxidación formando moléculas más complejas, tal como lo indica el aumento del residuo 500 °C+. Por otra parte, la ganancia total de combustibles (fuel gain) a partir del tratamiento enzimático con LiPp se encuentra en un rango de (-2) – (-10) % (datos no mostrados), lo cual indica que se produjo una mayor cantidad de residuo 500 °C+ en comparación con la cantidad total de combustible formado, quedando en evidencia el bajo potencial de bioconversión que posee esta enzima sobre el CXP.

## CONCLUSIONES

En este capítulo se presentan las conclusiones del Trabajo Especial de Grado, las cuales se presentan siguiendo el orden de los objetivos específicos del trabajo.

- La caracterización fenotípica es un método sencillo que permitió identificar a los hongos capacidad de producir EOE y utilizar HPAs y CXP como únicas fuentes de carbono y energía.
- Las actividades de las EOE (LiPp y LACp) de las especies BM-04, BM-36 y BM-39 fueron inducidas fuertemente por el CXP, mientras que en la cepa BM-04 la actividad de LACp fue inducida única y fuertemente por el afrecho.
- Quedó demostrado el potencial de bioconversión de la mezcla de enzimas Lac sobre el CXP.
- Se logró la conversión del residuo 500 °C+ hasta un 10 % en la muestra de CXP tratada con la mezcla enzimática de LACp.
- Se obtuvo una ganancia total de combustibles (fuel gain) hasta un 10 % en la muestra de crudo tratada con la mezcla enzimática de LACp.
- En este trabajo de investigación se observaron cambios leves de gravedad API, conversión de asfaltenos y contenido de saturados, aromáticos y resinas de los crudos biotratados con la mezcla de enzimas LACp y LiPp.
- Las muestras biotratadas con las mezclas de LACp y LiPp presentaron un incremento de la gravedad API con respecto a cada control.

- La mezcla de LiPp no logró convertir el residuo 500 °C+ de la muestra de CXP.
- A partir del tratamiento con la mezcla de LiPp se logró la conversión del gasóleo de vacío en destilados más ligeros y a su vez se originó la formación de moléculas más pesadas.

## **RECOMENDACIONES**

A continuación se presentan las recomendaciones relacionadas con el biotratamiento del crudo extrapesado campo Carabobo para que sean consideradas en trabajos posteriores y pueda ser optimizado este proceso.

- Se recomienda aumentar la escala del proceso de bioconversión del CXP a 500 g o más. De esta forma se podrían obtener más y mejores resultados analíticos.
- Debido a los cambios leves de gravedad API, conversión de asfaltenos y contenido de saturados, aromáticos y resinas de los crudos biotratados con la mezcla de enzimas LACp y LiPp, se recomienda trabajar en condiciones más severas de temperatura y presión.
- Se recomienda disminuir el contenido de sales presentes en el buffer empleado para resuspender las enzimas e iniciar el tratamiento del crudo, con el fin de reducir los costos del proceso.
- Se recomienda la purificación de las enzimas ligninolíticas LACp y LiPp para estudiar su efecto en la bioconversión del CXP.
- Se recomienda determinar la cantidad óptima de LACp y LiPp para llevar a cabo el biotratamiento del CXP.

## BIBLIOGRAFIA

- Aburto, J., Rojas, N. y Quintero, R. (2003). La Biotecnología Actual y su Impacto en la Industria de la Refinación del Petróleo. *Biotecnología Aplicada*. 20: 57-65.
- Alayón, M. (2004). Asfaltenos – Ocurrencia y Floculación. Laboratorio FIRP. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de los Andes. Mérida 5101 Venezuela. Cuaderno FIRP: 369 pp.
- Alboudwarej, H., Felix, J. y Taylor, S. (2006). La Importancia del Petróleo Pesado. Oilfield Review. Disponible: [http://www.slb.com/media/services/resources/oilfieldreview/spanish06/aut06/heavy\\_oil.pdf](http://www.slb.com/media/services/resources/oilfieldreview/spanish06/aut06/heavy_oil.pdf). [Consulta: 2006, marzo 16]
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. y Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4ta ed. New York: John Wiley & Sons, INC. 868 p.
- Arellano, H., Gonzalez, E. y Duhalt, V. (2004). Biocatalytic transformation of petroporphyrins by chemical modified cytochrome C. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 790-798.
- ASTM-D-4124-01 (2001). Test Methods for Separation of Asphalt into Four Fractions. *Annual Book of ASTM Standards*, 01.
- Baborova, P. y Moder, M., Baldrian, P., Cajthamlova, K. y Cajthaml, T. (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex Lacteus*, and degradation of polycyclic aromatics hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157: 248-253.
- Bartra, J. (2005). Alergia a Hongos. Disponible: [http://www.faes.es/archivos\\_pdf/download/bases\\_bibliograficas/asma\\_rinitis/2005/AR\\_105.pdf](http://www.faes.es/archivos_pdf/download/bases_bibliograficas/asma_rinitis/2005/AR_105.pdf) [Consulta: 2007, marzo 6]
- Bohinski, R. C. (1987). *Bioquímica*, 2da ed. México: Addison-Wesley Iberoamericana. 640 p.

- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267: 99-102.
- Bressler, D. C., Kirkpatrick, L. A., Foght, J. M., Fedorak, P. M y Gray, M. R. (2000). Denitrogenation of carbazole by combined biological and catalytic treatment. *Am. Chem. Soc.* 48: 44-46
- Dávila, G. y Vásquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico.* 30:29-51.
- Carbognani, L. y Méndez, A. y Sánchez, V. (1999). Caracterización de Crudos Venezolanos. Orígenes, Razones y Necesidades. *Revista Acta Científica Venezolana.* 50: 11-17.
- Centeno, G., Trejo, F., Ancheyta, J. y Carlos, A. (2004). Precipitación de Asfaltenos del Crudo Maya en un Sistema a Presión. *Rev. Soc. Quim.* 48: 179-188.
- Córdoba, J., León, V., y Muñoz, S. (2004). Manual de Procedimiento en la Preparación y Rompimiento de Emulsiones de Bitumen en el Proceso de Biomejoramiento. Informe Técnico Confidencial, Unidad de Biotecnología del Petróleo, Fundación IDEA.
- Coyle, C. L., Siskin, M. Ferrughelli, D., Logan, M., Zylstra, G. (2000). Biological activation of aromatics for chemical processing and/or upgrading of aromatic compounds, petroleum coal, resid, bitumen and other petrochemical streams. U.S Patent. 6, 156, 946
- Curtis, C y Kopper, R. (2002). Yacimientos de Petróleo Pesado. *Oilfield Review*.. Disponible:  
[http://www.slb.com/media/services/resources/oilfieldreview/spanish02/win02/p32\\_55.pdf](http://www.slb.com/media/services/resources/oilfieldreview/spanish02/win02/p32_55.pdf). [Consulta: 2007, enero 15].
- Chaillan, F., Fleche, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A. y Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res. Microbiol.* 155: 587-595.

- Fedorak, P. M., Semple, K. M., Vasquez-Duhalt, R. y Westlake, W. S. (1993). Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 429-437
- Fengel, D. y Wegener, G. (1989). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter, Berlin.
- Ferrari, M. D., Albornoz, C. y Neirotti, E. (1994). Biodegradability in soil of residual hydrocarbons in petroelum tank bottoms. *Rev. Argent. Microbiol.* 26:157-170
- Gary, J. H. y Handwerk, G. E. (1980). *Refinación de Petróleo. Tecnología y Economía.* 4ta ed. España: Reverté, S.A. 541 p
- Gianfreda, L. y Rao, M. (2004). Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soil: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 339-354.
- Gray, K. A., Mrachko, G. T. y Squires, C. H. (2003). Biodesulfuration of fossil fuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 540-546
- Groenzin, H. y Mullins, O. C. (1999). Asphaltene molecular size and structure. *Chem. Phys.* 103: 11237-11245
- Hernández, S., Jelambi, C. y Requena, A. (2001). Evaluación S.A.R.A. de alimentaciones al proceso de coquización retardada. Disponible: <http://www.tf.usb.ve/miqusb/voli/no3/hernandez-jelambi.pdf>. [Consulta: 2007, junio 25].
- Himmelblau, D. M. (1997). *Principios Básicos y Cálculos en Ingeniería Química.* 6ta ed. México: Prentice-Hall Hispanoamericana. 728 p.
- Kapoor, K., Jain, M., Mishra, M. y Sing, C. (1978). Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin and humus formation by cellulolytic fungi. *Ann Microbiol (Paris)* B(4):613-620.
- Kirk, T. K. y Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kirkwood, K. M, y col. (2004). *Prospects for biological upgrading of heavy oils and asphaltenes.* Amsterdam: Elsevier Science. 113-143 p.

- Layrisse, I., Rivas, H., Acevedo, S., Medina, R., Sánchez, M. y Utrera, M. (1984). Composición y Características Físico-Químicas de Crudos Extrapesados. *Revista Técnica Intevep*. 4: 3-18.
- León, V. (2001). Nuevos Enfoques Sobre la Visión Molecular de un Crudo Pesado. *Visión Tecnológica*. 5: 131-137
- León, V. y Kumar, M. (2005). Biological upgrading of heavy crude oil. *Biotechnol. Bioprocess. Eng*. 10: 471-481.
- Lin, S. Y. y Dence, C. W. (1992). *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Derlin.
- Martínez, A. R. (2006). ¿Reservas Confusas?. *Petroleumworld. Energía, Petróleo y Gas en Latinoamérica y el Mundo*. Disponible: <http://www.petroleumworld.com.ve/pdf/pdvsa%202005%20financials.pdf>.htm. [Consulta: 2006, diciembre 6].
- Martínez, A. (2004). *La faja del Orinoco*. Caracas: Galac
- Marzin, R. (2002). *Asociación estratégica de la faja del Orinoco*. PDVSA-Intevep.
- Mester, T. y Field, J. A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produce by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem*. 273: 15412-15417.
- Meyer, S. y Steinhart, H. (2000). Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost mixture. *Chemosphere*. 40: 359-367
- Monticello, D. J. (2000). Biodesulfuration and the upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol*. 11: 540-546
- Morales, A. (2005). HDHPlus® Tecnología Venezolana. *Energía y Petróleo para el Pueblo*. [aporrea.org](http://www.aporrea.org). Disponible: <http://www.aporrea.org/energia/a15363.html>. [Consulta: 2007, febrero 14]
- Muñoz C., S. (2004). *Mejoramiento de los Crudos Pesados con Actividad Bacteriológica*. Trabajo Especial de Grado. Inédito. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

- Murgich, J. Abanero, A. J. y Strausz, P. O. (1999). Molecular recognition in aggregates formed by asphaltene and resin molecules from the Athabasca oil sand. *Energ. Fuel.* 13: 278-286
- Naranjo, L., Lamas-Maceiras, M., Ullan R. V., Campoy, S., Teijeira, F., Casqueiro, J. Y Martin, J. F. (2005) Characterization and expression studies of the oatI gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an  $\omega$ -aminotransferase: Induction by L-lysine, L-ornithine and L-arginine and repression by ammonium. *Molecular Genetics and Genomics.* 28: 1-11
- Naranjo, L., Urbina, H., De Sisto, A. y León, V. (2007). Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. 2-25 p.
- Nishijima, W., Shoto, E. y Okada, M. (1997). Improvement of biodegradation of organic substance by addition of phosphorus in biological activated carbon. *Wat. Sci. Tech.* 36: 251-257.
- Oudot, J y Dupont, J., Haloui, S. y Roquebert, M. (1993). Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil. Biol. Biochem.* 25: 1167-1173.
- Papinutti, V., Diorio, L. y Forchiassin, F. (2003). Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*; producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 16-20.
- PDVSA, Plan Siembra Petrolera (2006-2012). Aspectos tecnológicos Plan Siembra Petrolera. Ministerio de Energía y Petróleo. Disponible: [http://www.camarapetrolera.org/plan\\_refinacion\\_pdvsa\\_2006\\_2012.pdf](http://www.camarapetrolera.org/plan_refinacion_pdvsa_2006_2012.pdf) [Consulta: 2007, marzo 15]
- Peláez, F, Martínez, M. J y Martínez A. T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes evolved in lignin degradation. *Mycol. Res.* 99: 37-42

- Pereira, P. y col. (1999). La Investigación y Desarrollo en Mejoramiento de Crudos Extrapesados en PDVSA-INTEVEP: AQUACONVERSION. Revista Acta Científica Venezolana. 50: 48-53.
- Pineda, G. y Mesta, A. (2001). Petroleum Asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. Rev. Latinoam. Microbiol. 43: 143-150.
- Pineda, G. y Arguello, G. y Mesta, A. (2002). Biodegradación de Asfaltenos por un Consorcio Microbiano Aislado de Petróleo Crudo “Maya”. Rev. Int. Contam. Ambient. 18: 67-73.
- Pineda, G., Boll, G., Lira, C. y Mesta, A. (2004). A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. Biodegradation. 15: 145-151.
- Potellá, C. y Quiroz, R. (2006). La Energía como Factor Activo de la Integración Latinoamericana. Disponible: <http://www.iea.org/Textbase/work/2002/calgary/Vielmap.pdf>. [Consulta: 2007, febrero 21].
- Premuzic, E., Lin, M. S., Bohenek, M. y Zhou, W. M. (1999). Bioconversions in asphaltenes and heavy crude oils. Energ. Fuel. 13: 297-304.
- Premuzic, E., Lin, M. S. y Manowitz, B. (1994). The significance of chemical markers in the bioprocessing of fuels. Fuel Process Technol. 40: 227-239
- Salager, J. L. (1999). Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para Obtener las Propiedades Deseadas. Mérida, Venezuela: Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos (FIRP). Escuela de Ingeniería Química. Universidad de los Andes. 19 p.
- Salas, C., Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D. y Vicuna, R. (1995). Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. Biotechnol. Appl. Biochem. 21: 323-333.
- Sánchez, J. E. (2000). Capítulo III: Crecimiento y Fructificación de los Hongos. [Libro en línea]. Disponible:

- [http://200.23.34.74/Libros\\_Digitales/Libro%20Pleurotus/Cap.3.pdf](http://200.23.34.74/Libros_Digitales/Libro%20Pleurotus/Cap.3.pdf). [Consulta: 2007, marzo 6].
- Sánchez, G. (2002). Capítulo II: La Célula. El metabolismo celular: generalidades. Enzimas. Disponible: <http://www.santillana.com.ar/02/natu/poli/enzimas.pdf>. [Consulta: 2007, marzo 7]
- Saparrat, M. C., Bucszinsky, A., Tournier, H., Cabello, M. and Arambarri, A. (2000). Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:64-68.
- Saparrat, M. C., Guillen, F., Arambarri, A., Martínez, A. y Martínez, M. (2002). Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1534-1540.
- Saparrat, M.C., Hammer, E. (2006). Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. *J Basic Microbiol* 46:28-33.
- Sheu, E. (2002). Petroleum Asphaltene-Properties, Characterization, and issues. *Energ. Fuel.* 16: 74-82
- Shimada, M. y Higuchi, T. (1983). Recent advances in lignin biodegradation research. En: Recent advances in lignin biodegradation research. T. Higuchi, H. M. Chang y T. K. Kirk (Eds.). Uni Publischer. Tokio, 195-208.
- Speight, J. G. y Moschopedis, S. E. (1981). On the molecular nature of petroleum asphaltenes, pp. 1-15. In Bunger J.W. and Li, N. C. *Chemistry of asphaltenes*. Am. Chem. Soc., Washington D.C.
- Tien, M. y Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Science.* 221: 661-663.
- Troller, J., Smith, J., Leisola, M., Kallen, J., Winterhalter, K. y Fiechter, A. (1988). Crystallization of a lignin peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bio. Technol.* 6: 571-573.
- Van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J. y Truper, G. (1990). Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. *Arch. Microbiol.* 153: 324-328.

- Van Hamme, J. D. y Fedorak, P., Foght, J., Gray, M. y Dettman, H. (2004). Use of novel fluorinated organosulfur compound to isolate bacteria capable of carbon-sulfur bond cleavage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1487-1493.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 503-549
- Vázquez-Duhalt, R. (1998). Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Advances in Bioprocess Engineering II* (Galindo E. and Ramírez O.T. Eds.) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 183-207 pp.
- Vázquez-Duhalt, R., Bremauntz M., Barzana, E. y Tinoco, R. (2002). Enzymatic Oxidation Process for Desulfurization of Fossils Fuels. Patente: U.S Patent. 6: 461, 859.
- Vázquez-Duhalt, R., Torres, E. Valderrama, B. Y Le Borgne, S. (2002). Hill biochemical catalysis impact the petroleum refining industry?. *Energ. Fuel.* 16: 1239-1250.
- Visbreaking Process. (2003). Process technology and equipment. Disponible: <http://www.uop.com/objects/28%20%20Visbreaking.pdf>. [Consulta: 2007, marzo 17].
- Wade. L. G (1993). *Química Orgánica*. 2da ed. México: Prentice Hall Inc. 1312 p.
- Xu, G. W., Mitchell, K. W. y Monticello, D. J. (1998). Fuel product produced by demetalizing a fossil fuel with an enzyme. U.S Patent. 5: 624, 844
- Zheng, Z. y Obbard, J. P. (2002). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 3-9.