

Evaluación del comportamiento de un consorcio bacteriano de aguas de inyección en reactores escala laboratorio bajo condiciones similares a campo con adición de nitrato y nitrito

Laura Vanessa Reyes Villamizar, Jesús David Ramírez Páez

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
Ingeniero Químico

Director

Viviana Sánchez Torres

Ingeniero Químico, MSc., PhD.

Codirector

Martha Eugenia Niño Gómez

Químico, MSc., PhD.

Ana Catalina Avella Vásquez

Ingeniero Químico, MSc., PhD.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida. De la misma manera, mis agradecimientos más sinceros a toda la familia Reyes Villamizar por estar siempre presentes. A mi madre y mi madrina por ser siempre las grandes promotoras de mis sueños. A mis abuelos; María del Carmen y Alberto Q.E.P.D. por haberme acogido como una hija más. A mis tías, Yolanda, Yanneth, Olga y Esperanza por ser siempre ejemplos que seguir; con ellas no solo comparto los apellidos pues también heredé gran parte de lo soy. A mi padre, por el apoyo financiero brindado en todo este proceso.

Mi profundo agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Biotecnología del ICP; especialmente a la ingeniera Ana Catalina y al equipo de bioprocesos por confiar en mí; por abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo en su prestigiosa institución. De igual manera, mis agradecimientos a la profesora Viviana Sánchez, principal colaboradora durante todo este proceso, quien, con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración, permitió el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, quiero expresar mis más grandes y sinceros agradecimientos a la Universidad Industrial de Santander, a la escuela de Ingeniería química, y a todo el equipo de profesores e investigadores que la conforman; quienes a través de la transmisión de sus valiosos conocimientos hicieron que pudiera crecer día a día como profesional íntegra, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia y dedicación.

Laura Vanessa Reyes Villamizar

Agradecimientos

A Dios antes que nada, quién me ha bendecido durante todo este camino. A mis padres Marisol Páez Espinel y Jesús Antonio Ramírez Capacho, que me educaron en valores y que con sacrificio y entrega me han apoyado en todo momento para llegar a ser una persona íntegra y un gran profesional. A mis abuelos y abuelas que me demostraron con su testimonio de vida que la perseverancia y el trabajo duro son el único camino para lograr cualquier objetivo. A mi familia que me ha enseñado el valor de tener un hogar y poder compartir con las personas que en verdad se ama, así como de que la vida va más allá de lo material.

A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología del ICP, al equipo de bioprocesos y en especial a la ingeniera Ana Catalina Avella Vásquez por permitirme hacer parte de su proyecto investigativo y orientarme en la última etapa de mi formación como ingeniero.

A la profesora Viviana Sánchez Torres, por guiarme a través de este proceso ya que gracias a su colaboración y diligencia se logró el exitoso desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander y más especialmente a la Escuela de Ingeniería Química y todo el personal humano que hace parte de ella ya que sus enseñanzas y apoyo contribuyeron a mi formación tanto profesional como personal.

Jesús David Ramírez Páez

Tabla de Contenido

Introducción	13
1.1 Bacterias sulfato-reductoras (BSR) y su influencia en la corrosión	17
1.2 Corrosión influenciada microbiológicamente.....	18
1.3 Bacterias nitrato-reductoras (BNR) y biocompetencia.	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivos generales.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Metodología.....	22
3.1 Preparación del Inóculo	22
3.2 Diseño del montaje	23
3.3 Operación de los biorreactores.....	25
4. Resultados.....	27
4.1 Comportamiento reactor control	27
4.2 Comportamiento de los reactores con tratamiento.....	30
4.2.1 pH y conductividad.....	30
4.2.2 Nitrato, nitrito y nitrógeno amoniacal.....	32
4.2.3 Sulfato y sulfuro de hidrogeno.....	35
4.2.4 Carbonato y bicarbonato	37
4.2.5 Ácidos orgánicos.....	39
4.2.6 Comportamiento microbiológico	41

5. Conclusiones.....	44
Referencias Bibliográficas	45
Apéndices.....	48

Lista de Tablas

Tabla 1. Condiciones de operación biorreactores escala laboratorio.....	23
---	----

Lista de Figuras

Figura 1. Principales reacciones propuestas en la corrosión anaerobia.	19
Figura 2. Impacto del nitrato en el ciclo del azufre en el sistema.	20
Figura 3. Metodología de investigación.	22
Figura 4. Esquema del montaje para un reactor con adición de $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$	24
Figura 5. Concentración de H_2S a la salida de R3.	28
Figura 6. Concentración de iones sulfato a la salida de R3.	29
Figura 7. Conteo bacteriano para R3.	29
Figura 8. Fotografías registradas el día 69 de operación para R3 a la altura de la salida del reactor.	30
Figura 9. pH medido a la salida de los reactores durante la operación.	31
Figura 10. Conductividad medida a la salida de los reactores durante la operación.	32
Figura 11. Concentración de iones nitrato a la salida de R1 y R2.	32
Figura 12. Consumo de iones nitrato para R1 y R2.	33
Figura 13. Concentración de iones nitrito a la salida de R1 y R2.	34
Figura 14. Concentración de nitrógeno amoniacal a la salida de R1 y R2.	35
Figura 15. Concentración de iones sulfato a la salida de R1 y R2.	36
Figura 16. Concentración de H_2S a la salida de R1 y R2.	37
Figura 17. (A) Concentración de carbonato y (B) bicarbonato a la salida de R1 y R2.	38
Figura 18. (A) Concentración de ácido acético (CH_3COOH) a la salida de R1 y R2. (B) Concentración de ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) a la salida de R1 y R2. (C) Consumo de	

ácido acético (CH_3COOH) para R1 y R2. (D) Consumo de ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) para R1 y R2.	41
Figura 19. (A) Conteo bacteriano a la salida de R1. (B) Conteo bacteriano a la salida de R2.	42
Figura 20. (A) Absorbancia medida para el tubo de dilución $10\text{E}-1$ en el tiempo para los reactores R1, R2 y R3. (B) Fotografía de los tubos de la dilución $10\text{E}-6$ para el día 27.	43

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE UN CONSORCIO BACTERIANO DE AGUAS DE INYECCIÓN EN REACTORES ESCALA LABORATORIO BAJO CONDICIONES SIMILARES A CAMPO CON ADICIÓN DE NITRATO Y NITRITO.*

AUTORES: LAURA VANESSA REYES VILLAMIZAR – JESÚS DAVID RAMÍREZ PÁEZ.

**

PALABRAS CLAVE: Biocompetencia, Biocorrosión, Control de agiamiento, BNR, BSR, Biorreactor.

DESCRIPCIÓN:

Con el fin de mitigar los efectos de la biocorrosión se han desarrollado diferentes tecnologías, siendo el uso de biocidas la más popular; sin embargo y con el objetivo de disminuir el impacto que los biocidas pueden generar en el ambiente se planteó como alternativa la promoción de la biocompetencia entre bacterias sulfato reductoras (principales causantes de la biocorrosión) y bacterias nitrato reductoras.

Este estudio evaluó el efecto de la estimulación de la biocompetencia, mediante el uso de $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$, y el impacto que tiene esta sobre la producción de H_2S , operando tres reactores de flujo ascendente durante 90 días. La arena y agua de inyección empleadas fueron traídas de un campo de producción y fueron empleadas como material empacado y agua de alimentación respectivamente. Dos de los sistemas de reacción, R1 y R2, fueron dopados con una mezcla $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$: [10/10] ppm y [40/40] ppm respectivamente, el tercer sistema, R3, se operó sin adición de nitrato/nitrito. Se logró la inhibición de la producción de H_2S en el sistema R2 de mayor dosificación, manteniendo una concentración cercana a 2 ppm, por lo que se establece que esta dosificación permitió frenar el metabolismo de consumo de sulfato y en consecuencia la producción de sulfuro por parte de las bacterias sulfato reductoras de forma prolongada en el tiempo. Además, tanto las bacterias sulfato reductoras que fueron sometidas al tratamiento de 10/10 ppm como de 40/40 ppm de nitrato/nitrito mostraron una velocidad de crecimiento menor en comparación con las bacterias sulfato reductoras que no estuvieron bajo el tratamiento de nitrato/nitrito.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Instituto Colombiano del Petróleo (ICP). Directora: Viviana Sánchez Torres, Ingeniera Químico, MSc., PhD. Codirectora interna: Martha Eugenia Niño Gómez, Química, MSc., PhD. Codirectora externa: Ana Catalina Avella Vásquez, Ingeniera Química, MSc., Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE BEHAVIOR OF A BACTERIAL CONSORTIUM OF INJECTION WATER IN LABORATORY SCALE REACTORS UNDER SIMILAR FIELD CONDITIONS WITH ADDITION OF NITRATE AND NITRITE. *

AUTHORS: LAURA VANESSA REYES VILLAMIZAR – JESÚS DAVID RAMÍREZ PÁEZ.

KEYWORDS: Biocompetence, Biocorrosion, Souring control, SRB, NRB, Biorreactor

DESCRIPTION:

To mitigate the effects of biocorrosion, different technologies have been developed, being the use of biocides the most popular. However, and targeting to reduce the impact that these ones can have in the environment it was proposed the evaluation of the promotion of the biocompetence between the population of sulfate reducing bacteria (main cause of biocorrosion) and nitrate reducing bacteria.

This study evaluated the effect of biocompetence stimulation using $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$ over H_2S production, by operating three continuous up-flow reactors for 90 days. Sand and injection water were brought from a production field to be used as packing material and feed respectively. Two of the reaction systems, R1 and R2, were doped with a mixture of $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$: [10/10] ppm and [40/40] ppm respectively, while the third system, R3, was operated without nitrate/nitrite addition. It was possible to achieve the inhibition of H_2S production in R2 the one with highest dosage, where these concentrations remained close to 2 ppm, thus it was established that this dosage treatment allows to stop sulfate consumption metabolism and in consequence sulfide production by sulfate reducing bacteria over time. In addition, the sulfate reducing bacteria that were put through to the presence of nitrate/nitrite at 10/10 ppm as the ones put through to 40/40 ppm showed a slower growth speed compared with sulfate reducing bacteria that weren't under the treatment of nitrate/nitrite.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Instituto Colombiano del Petróleo (ICP). Directora: Viviana Sánchez Torres, Ingeniera Químico, MSc., PhD. Codirectora interna: Martha Eugenia Niño Gómez, Química, MSc., PhD. Codirectora externa: Ana Catalina Avella Vásquez, Ingeniera Química, MSc., Ph.D.

Introducción

Para mejorar la recuperación de petróleo en los campos de extracción es común el uso de agua de mar o agua con alto contenido de sales, entre ellas los sulfatos. Las bacterias sulfato reductoras o BSR por sus siglas en español, toman la energía para su crecimiento a partir de la oxidación de hidrógeno molecular o materia orgánica, reduciendo los iones sulfato (SO_4)²⁻. Esta ruta metabólica produce cantidades de CO_2 y de sulfuro, principalmente sulfuro de hidrógeno (H_2S). Los altos contenidos de H_2S son indeseables ya que tienden a reaccionar con el hierro del material de las tuberías produciendo sulfuro de hierro (FeS), lo cual genera problemas de corrosión (Little, Wagner y Mansfield, 1992).

Las concentraciones de sulfuro producido se han controlado mediante el uso de biocidas o inhibidores de la reducción del sulfato (Johnson, R. J. et al., 2017). Estas estrategias han presentado limitaciones en cuanto a efectividad, debido a que las BSR crecen en biopelículas que se adhieren a las tuberías y que representan una barrera que impide que los biocidas penetren y actúen sobre las poblaciones microbianas (Widdel, 1988; Gieg, Jack y Foght, 2001). De igual forma, se debe considerar, que los biocidas suponen un riesgo ambiental significativo debido a la alta toxicidad que algunos pueden llegar a tener (Reinsel, Sears, Stewart y McInerney, 1996), lo que a su vez pone en riesgo a los operarios (Gieg, Jack y Foght, 2001). Para dar otro enfoque al control de sulfuro se ha empleado el uso de nitrato, el cual tiene el potencial de estimular la biocompetencia entre dos poblaciones bacterianas, las BSR y las bacterias nitrato reductoras (BNR)(Davidova, Hicks, Fedorak y Suflita 2001); las cuales cuentan con una ventaja termodinámica respecto a las BSR, ya que al consumir nitrato obtienen mayor energía por cada donador de electrones que metabolizando el sulfato. Por ejemplo, el cambio de energía libre de

Gibbs para la oxidación del acetato es de -47 kJ por mol de sulfato, mientras que la reacción de oxidación llega a representar un cambio de -495 kJ por mol de nitrato. De forma tal que, en presencia de nitrato la actividad de las BNR será mayor y reducirá la actividad de las BSR, finalmente mitigando la producción de H_2S (Eckford y Fedorak, 2002).

En el laboratorio de Biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo se han llevado a cabo estudios de biocompetencia siendo el más reciente un estudio con biorreactores de arena empacada, a 55 °C, operados en continuo con agua de inyección estéril suplementada con nutrientes, entre ellos sulfato. Los reactores fueron inoculados con consorcios bacterianos asilados de las mismas aguas de inyección. Posteriormente para estimular las BNR y controlar la producción de H_2S se suministraron concentraciones de 80/80 y 100/100 ppm de nitrato/nitrito al reservorio de agua de inyección de la alimentación de los biorreactores, logrando reducir las concentraciones de H_2S y la inhibición en la producción de este metabolito a través de experimentos intermitentes. Este estudio previo se llevó a cabo para algunos pozos de producción, luego de largos periodos de incubación para lograr la maduración de la biopelícula y así asemejar las condiciones de los pozos. El sistema que se va a tratar debe ser representado correctamente ya que el efecto del tratamiento con nitrato es influenciado en gran medida por la actividad microbiana y las condiciones fisicoquímicas particulares de cada uno de los campos (Johnson, R. J. et al., 2017).

El propósito de la realización de este trabajo de investigación es evaluar la prevención del agriamiento (producción de H_2S) en los biorreactores del laboratorio con condiciones similares a las de un pozo de producción de hidrocarburos, para lo cual se plantea inyectar una solución de nitrato/nitrito desde el inicio de la operación de los reactores, empleando concentraciones menores a las usadas para controlarlo. Con esto se busca probar si el nitrato/nitrito permite la prevención

de la actividad de las BSR desde periodos de temprana formación de biopelículas y anticipar las condiciones para que se empiece a dar el agriamiento de un yacimiento petrolero.

1. Marco teórico

Para estudiar el comportamiento de las poblaciones de BSR y BNR, se han realizado trabajos experimentales con adición de nitrato en ambientes similares a las condiciones de pozo donde se inyecta el agua que es necesaria para la recuperación del crudo. Se han empleado columnas de materiales como policarbonato, Perspex o vidrio (Reinsel et al., 1996; Myhr, Lillebo, Sunde, Beeder y Torsvik, 2002; Callbeck, C. M. et al., 2001) que operan como biorreactores de arena empacada, en condiciones anaerobias, empapados con crudo e inoculados con consorcios bacterianos provenientes de los pozos de estudio. Se alimentan los biorreactores con agua de mar sintética o medios preparados y se lleva un seguimiento de las concentraciones de sulfuros que permiten monitorear la actividad de las BSR. En un estudio realizado por Reinsel M. et al. se analizó la corrosión microbiana a 60 °C con la adición de diferentes concentraciones de nitrato y nitrito. Con una concentración de nitrato de 60.3 ppm en el medio de alimentación el cual era consumido y convertido a nitrito dentro del reactor, se observó una disminución de sulfuro de 126 ppm hasta niveles menores a 5 ppm, y se probó que en condiciones termofílicas se puede emplear la biocompetencia y el nitrato para controlar la corrosión. Otros estudios también reportan buenos resultados a temperaturas más bajas, como un estudio realizado por Myhr et al. de la Universidad de Bergen en Noruega, operando un reactor a alrededor de 20°C, donde se logró inhibir la producción de sulfuro empleando una concentración de nitrato de 42.5 ppm en el medio el cual era consumido, bajando los niveles de sulfuro de 15 ppm hasta 2 ppm (Myhr, S. et al., 2002). Adicionalmente, estudios como el de Callbeck et al. (2001) en el que además de llevarse un seguimiento de las concentraciones de nitrato, nitrito, sulfato y sulfuro a la salida del reactor también se midieron algunos ácidos orgánicos, se encontró que las concentraciones de propionato

y butirato disminuían mientras que por el contrario aumentaba la concentración de acetato a la par que se evidenciaba una producción de sulfuro en los sistemas de adición en continuo.

1.1 Bacterias sulfato-reductoras (BSR) y su influencia en la corrosión

Las BSR tienen la capacidad de usar sulfato como aceptores finales de los electrones en la respiración anaerobia (Barton y Tomei, 1995). Este grupo en su mayoría es anaerobio estricto y puede obtener la energía para su crecimiento al oxidar nutrientes orgánicos o hidrógeno molecular mientras el sulfato es reducido a H_2S (Postgate, 1984). La reducción biológica del sulfato por las BSR es el único proceso conocido en el cual, en ambientes acuáticos y a diferentes temperaturas ($0 - 75\text{ }^\circ\text{C}$), se forma H_2S a partir de sulfato (Cord-Ruwisch, Kleinitz y Wideel, 1987). El H_2S es un gas tóxico que genera diversos problemas ambientales y económicos a la industria del petróleo, ya que contamina las fuentes de hidrocarburos, corroe las superficies, desmejora la calidad del producto y genera precipitados de FeS (Davidova, I. et al, 2001), que pueden generar incluso taponamiento del pozo (Herbert, 1987).

Las BSR pueden ser clasificadas nutricionalmente en dos grandes grupos: las especies que pueden oxidar de forma incompleta sustratos orgánicos, obteniendo acetato al final de su metabolismo y las especies que pueden oxidar completamente diferentes donadores de electrones hasta llegar a dióxido de carbono. Para la mayoría, el lactato es un sustrato excelente ya sea para ser oxidado a acetato o a dióxido de carbono. Aun así, hay muchas especies de BSR que pueden usar el hidrógeno molecular como donador de electrones. Esta ruta metabólica también emplea el sulfato como receptor de electrones finales e involucra obligatoriamente a la enzima hidrogenasa (Cord-Ruwisch, R. et al., 1987).

1.2 Corrosión influenciada microbiológicamente

Una vez una superficie metálica es sumergida en un ambiente acuoso inicia la colonización microbiológica y se forma una biopelícula, ensamblado de células microbianas asociadas a una superficie y contenidas en una matriz de material polimérico. Esta matriz está conformada por sustancias extracelulares poliméricas, principalmente polisacáridos; que forman un gel con un contenido de agua de hasta 95% (Donlan 2002). Los microorganismos pueden tener influencia sobre la corrosión al cambiar las condiciones electroquímicas entre el metal y la fase acuosa, cualquier efecto biológico que favorezca procesos anódicos o producto metabólico excretado que sea químicamente agresivo puede acelerar la corrosión del metal (Videla y Herrera, 2005).

Las BSR actúan principalmente como despolarizadoras catódicas: en primera instancia el metal se polariza, con el agua y el sulfuro presentes y pierde cationes metálicos. Una vez los cationes reaccionan con el sulfuro se genera hidrógeno molecular y los electrones liberados producen hidrógeno atómico a partir de los hidronios disueltos; allí el hidrógeno atómico o molecular permanece en el material hasta que se establece un equilibrio dinámico. Finalmente, debido a la capacidad metabólica de algunas BSR, el hidrógeno es removido a través de una reacción de oxidación que emplea sulfato como aceptor de electrones. Esto resulta en la corrosión del metal, donde se forman sulfuro de hierro principalmente y se continúa favoreciendo la reacción catódica. El proceso descrito se evidencia de forma gráfica en la Figura 1 (Cord-Ruwisch, R. et al., 1987).

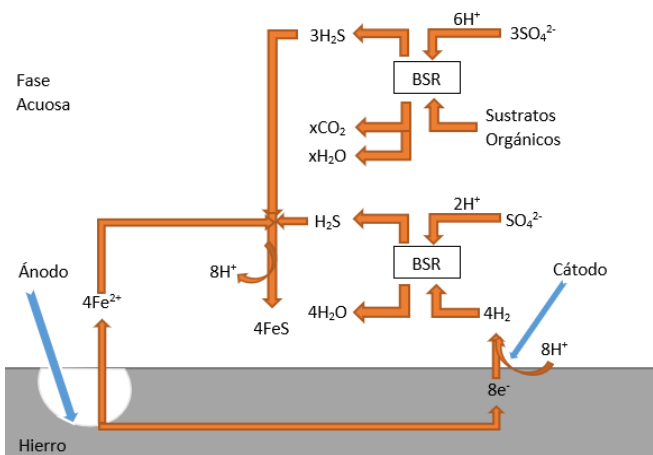


Figura 1. Principales reacciones propuestas en la corrosión anaerobia. Adaptado de Cord-Ruwisch, Kleinitz y Widdel (1987).

1.3 Bacterias nitrato-reductoras (BNR) y biocompetencia.

Un enfoque alternativo que se le ha dado al control de sulfuro en los campos es el uso de nitrato, el cual tiene el potencial de establecer competencia entre dos grupos de bacteria: bacterias nitrato reductoras (BNR) y bacterias sulfato reductoras (BSR) (Davidova, I. et al, 2001).

La inyección de nitrato ha probado ser efectiva en la disminución de sulfuro en los efluentes en los campos al estimular el crecimiento de bacterias nitrato reductoras heterotrófas (BNRh) y bacterias nitrato reductoras sulfuro-oxidantes (BNRso) (Callbeck, C. M. et al., 2001). Las primeras compiten directamente con las BSR por los donadores de electrones orgánicos, por lo que potencialmente inhiben el metabolismo de las BSR; las BNRso oxidan directamente el H_2S (Hubert y Voordouw, 2007). El impacto del nitrato en el ciclo del azufre y el estímulo de las NRB se muestra en la Figura 2.

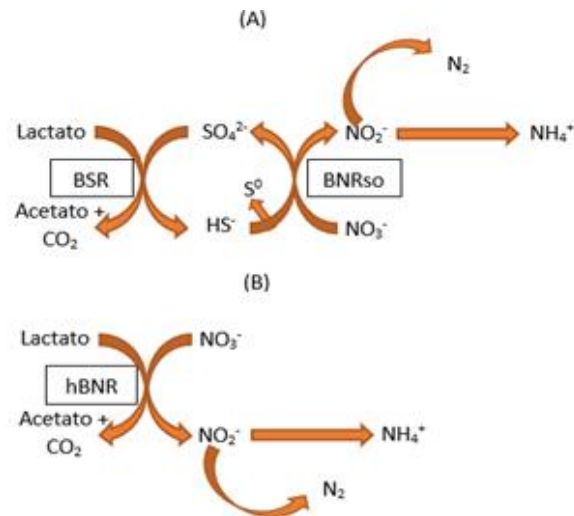


Figura 2. Impacto del nitrato en el ciclo del azufre en el sistema. (A) Sulfuro producido por actividad de BSR que se recicla a sulfato por BNRso, reduciendo nitrato a nitrógeno o amonio. (B) Las BNRh compiten con las BSR por los donadores de electrones orgánicos, como lactato. Adaptado de Hubert y Voordouw (2007).

La reducción del nitrato a nitrógeno o amonio resulta termodinámicamente más favorable que la reducción del sulfato (Zehnder, 1988). Por lo tanto, en presencia de nitrato, si se tiene un consorcio con BNR y BSR, las BNR deberían dominar (Reinsel et al., 1996). Además, cabe destacar, que como se observa en la Figura 2, la reducción del nitrato por parte de las BNR produce nitrito, el cual afecta específicamente a las bacterias que usan el sulfato; ya que inhibe la sulfito-reductasa, enzima presente en todas las BSR y que interviene en la reacción de sulfito a sulfuro, lo que consecuentemente permite detener la producción de H₂S en el metabolismo de estas bacterias (Greene, E. A. et al., 2006).

2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

Evaluar la prevención de la formación del H_2S a través de la aplicación temprana del nitrato/nitrito en reactores a escala laboratorio bajo condiciones similares a campo.

2.2 Objetivos específicos

Operar bajo condiciones similares a campo reactores de lecho fijo y flujo continuo.

Estudiar el impacto de la inyección continua de nitrato/nitrito en bajas concentraciones sobre la producción de H_2S .

Conocer y estudiar el comportamiento biológico y fisicoquímico ante la presencia y ausencia del nitrato/nitrito.

3. Metodología

La variable de estudio fue la concentración de una mezcla 1:1 de NaNO_3 / NaNO_2 , en 3 niveles: 0 ppm, 10/10 ppm, 40/40 ppm. La metodología por la cual se llevó a cabo la investigación se muestra en la Figura 3.

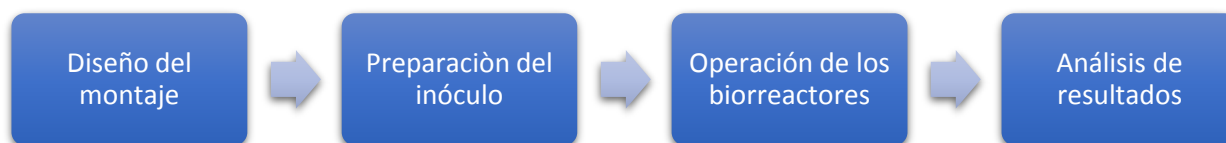


Figura 3. Metodología de investigación.

3.1 Preparación del Inóculo

Para la preparación del inóculo se adicionó 90 mL de medio Starkey (Apéndice A) en viales sellados, se les realizó un proceso de intercambio de gases con N_2 con el fin de garantizar un medio anaerobio, se llevaron al equipo de autoclave a 121°C y 15 lb de presión por 15 minutos. Se realizó un ajuste del pH (7.2) con una solución estéril de NaHCO_3 al 20% y finalmente fueron inoculados con 10 mL de agua de inyección del pozo de producción objeto del estudio. Se llevaron a la incubadora a 37°C , durante 7 días posteriormente fueron almacenados a 4°C .

3.2 Diseño del montaje

Este nuevo estudio pretende simular directamente las condiciones de campo y el potencial de efectividad que tiene la alimentación en continuo de nitrato/nitrito.

Para esta investigación se realizó un nuevo diseño y disposición del montaje de los reactores con las facilidades para la alimentación continua de nitrato/nitrito y del agua de inyección. Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Condiciones de operación biorreactores escala laboratorio.

Condiciones de operación	
Temperatura	55 °C
Presión	Atmosférica
Flujo de entrada reactor	1.8 mL/min
pH	7.5-8.5

El agua destinada a la operación de los reactores fue traída del pozo en estudio, ésta cuenta con biocidas, anticorrosivo e inhibidor de incrustaciones adicionados en la operación normal en el campo; no se le realizó ningún otro proceso ni le fue adicionado ningún otro compuesto. El agua se suministró a los biorreactores mediante líneas de flujo dispuestas desde pimpinas sometidas a atmósfera de nitrógeno. Se dispusieron los siguientes reactores: un reactor control sin la adición de nitrato/nitrito y dos reactores donde se realizó la adición de diferentes concentraciones de la relación nitrato/nitrito, cuyo diseño se muestra en la Figura 4.

Los reactores son en vidrio, cuentan con un volumen interno de 2 L, están equipados con una chaqueta la cual se conecta a un baño de calentamiento para mantener una temperatura promedio de 55 °C, simulando así las condiciones del campo.

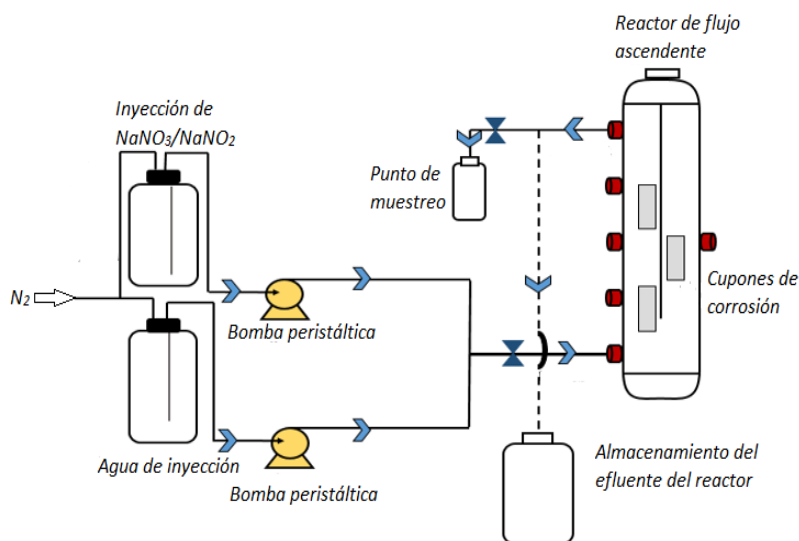


Figura 4. Esquema del montaje para un reactor con adición de $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$.

El montaje cuenta con dos pimpinas por reactor, cada una con 2 válvulas de bola en acero inoxidable, la primera permite la entrada del nitrógeno para garantizar una atmósfera anaerobia y la segunda salida permite el flujo agua o solución de nitrato según el caso. La salida de las pimpinas conecta a cabezotes de una bomba peristáltica, permitiendo así un control del flujo de entrada al reactor, el flujo ingresa por la parte inferior de la columna de vidrio/reactor.

La toma de muestras se realiza por medio de una manguera conectada en la parte superior del reactor desde donde se conecta con un control de nivel. Se cuenta adicionalmente con una conexión que permite recolectar el efluente del reactor en pimpinas de desecho.

La arena dispuesta dentro de las columnas se llevó al equipo de autoclave para eliminar material orgánico presente, antes de ser empacadas en la columna con el fin de garantizar la esterilización y evitar contaminación cruzada o con el ambiente.

3.3 Operación de los biorreactores

Se adicionaron 540 mL de agua de inyección por cada reactor, para permitir la formación del Biofilm, fueron sellados los puertos de entrada y salida, dejando únicamente la corriente de nitrógeno de la parte superior de cada uno de los reactores. Para el proceso de inoculación le fueron suministrados 50 mL de inóculo, depositando 10 mL en cada uno de los puertos dispuestos en el costado de los reactores. Finalmente se fijó una temperatura de 55 °C para el agua del baño termostático que pasa a través de la chaqueta de los reactores.

Se mantuvo una operación continua de los 3 biorreactores R1, R2, R3, bajo alimentación en continuo con agua de inyección del pozo en cuestión con adición en línea de nitrato/nitrito bajo diferentes concentraciones 10/10 ppm para R1, 40/40 ppm para R2 y R3 permaneció sin adición de nitrato/nitrito. Se tomaron muestras periódicamente durante su operación para análisis de especies sulfuradas, ácidos orgánicos, especies nitrogenadas y recuento de BSR/BNR; todos estos con el fin de tener un seguimiento de los receptores (sulfato y nitrato) y donantes de electrones (ácidos orgánicos) por los cuales van a establecer una competencia y la incidencia que va a tener la biocompetencia en el consorcio. Los parámetros fisicoquímicos fueron analizados en el Laboratorio de aguas y suelos del ICP. Los métodos y equipos usados para el análisis fisicoquímico se encuentran en el Apéndice B.

Adicionalmente se realizó un muestreo diario de pH y conductividad (Thermo Scientific Orion Star A214 Benchtop) en los primeros dos meses de operación como método de control directo de las condiciones dentro del reactor para garantizar que operaran el rango de pH adecuado que permitiese el normal desarrollo y crecimiento del consorcio bacteriano. A partir del 3er mes esta medición pasó a ser semanal.

El conteo bacteriano de BSR y BNR se realizó mediante PCR cuantitativa en el laboratorio de Microbiología del ICP. La PCR cuantitativa se basa en la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN para este caso particular *dsrA* (subunidad alfa de la enzima desasimilativa sulfito reductasa) y *narG* (nitrato reductasa), para las BNR. Esta técnica permite visualizar en tiempo real la progresión de la reacción en cadena de la PCR y cuantificarla mediante un fluoróforo de detección (SYBR Green I), permitiendo detectar cantidades mínimas de ADN presente en la muestra.

Al finalizar los 90 días de operación se realizó una prueba de conteo bacteriano por diluciones para cada reactor, la cual se basa en la transferencia de pequeños volúmenes de un cultivo original a viales consecutivos en pasos de 1:10. Se realizaron 6 diluciones a partir de una muestra de cada reactor. El estudio se llevó a cabo en un periodo de 28 días donde se monitoreó el crecimiento por absorbancia mediante un espectofotómetro (Epoch Microplate Spectofotometer, BioTek Instruments Inc, Vermont, USA) a una incidencia de 600nm. Esta prueba se hizo en medio Starkey para evaluar la actividad metabólica de las BSR que se encontraban dentro de los reactores para este momento de la operación.

4. Resultados

4.1 Comportamiento reactor control

Durante los primeros 22 días la producción de H_2S fue baja para el reactor control (R3), mostrando valores cercanos a los obtenidos en la caracterización de agua de inyección, los cuales fueron de 1.55 ppm para el primer lote de agua, suministrado del día 0 al 14 y de 1.99 ppm para el segundo lote de agua de inyección empleada (los valores obtenidos de la caracterización de los lotes de agua de inyección se presentan en el Apéndice C y se presentan en las gráficas como líneas continuas). El comportamiento de esta variable se muestra en la Figura 5 y se presenta en unidades de $\text{mg S}^{=}/\text{L}$. A partir de la medición del día 27 se evidenció un aumento en los niveles de sulfuro a la salida del reactor hasta aproximadamente 4 ppm, lo que sugiere un aumento de actividad de las BSR, logrando alcanzar una producción superior a 6 mg/L de sulfuro (día 37). En el reactor R3 al no tener adición de nitrato/nitrito se esperaba que se mantuvieran los niveles altos de producción de sulfuros. Sin embargo, los valores de sulfuros cayeron a 3.06 ppm para el día 41 de operación y 0.58 ppm para el día 44. A partir de este punto los valores comienzan a salir de tendencia, ya que no llegaron a superar las concentraciones de la línea base de agua de inyección en la alimentación (lote 2), salvo para el día 58 que se obtuvo un valor de 3.56 ppm y un pico puntual de 8.93 ppm para el día 72 de operación, lo cual indicaría mayores producciones de sulfuro, sin embargo, esto no se vio evidenciado en la analítica.

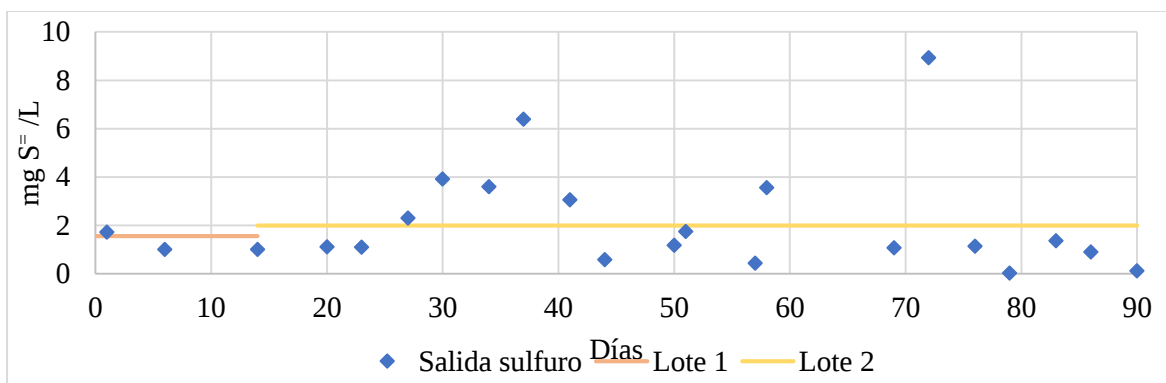


Figura 5. Concentración de H₂S a la salida de R3.

En el período inicial de operación donde no se registró producción de sulfuro las concentraciones de sulfato a la salida del reactor son muy cercanas a la línea de la caracterización del agua de alimentación del lote 1, hasta aproximadamente el día 14 como se muestra en la Figura 6. A partir de este día se observa un decrecimiento en el perfil de sulfato (Figura 6), presentando los valores mínimos de sulfato en los días 27 (25,7 ppm) y 34 (26.5 ppm) de operación los cuales corresponden con el aumento de sulfuro entre los días 20 y 34; por lo que se infiere que esta disminución en la concentración de éstos está directamente ligada a la actividad microbiana de las BSR; sin embargo, a partir del día 41 se muestra una disminución en la producción de sulfuro y se observa un aumento en el perfil de sulfato hasta alcanzar la línea base, indicando mínima actividad.

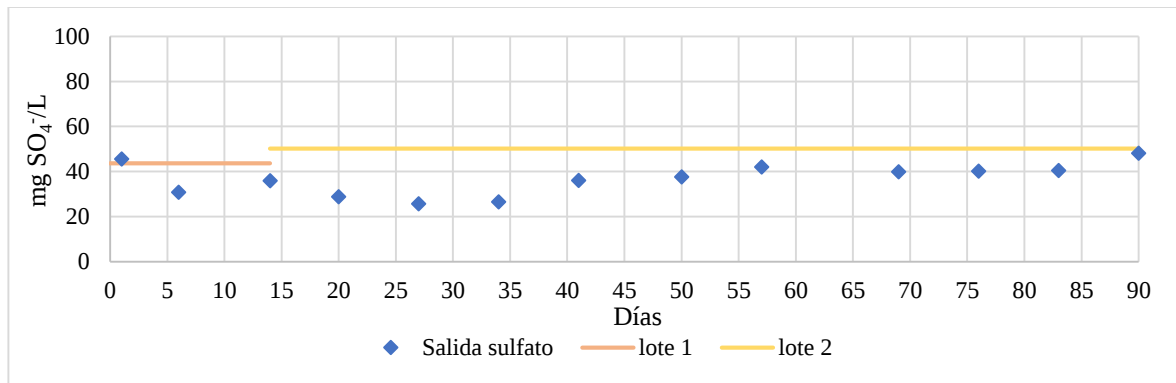


Figura 6. Concentración de iones sulfato a la salida de R3.

Dentro del reactor se observó una presencia tanto de BSR como BNR (Figura 7) siendo mayor la cantidad de BNR entre los días 30 y 70 de operación. En el día 69 dentro del reactor R3 se observó la formación de una capa laminar similar a un tejido, que se encontraba adherida a las paredes de la parte superior del reactor, cerca a la altura de la salida al efluente (Figura 8).

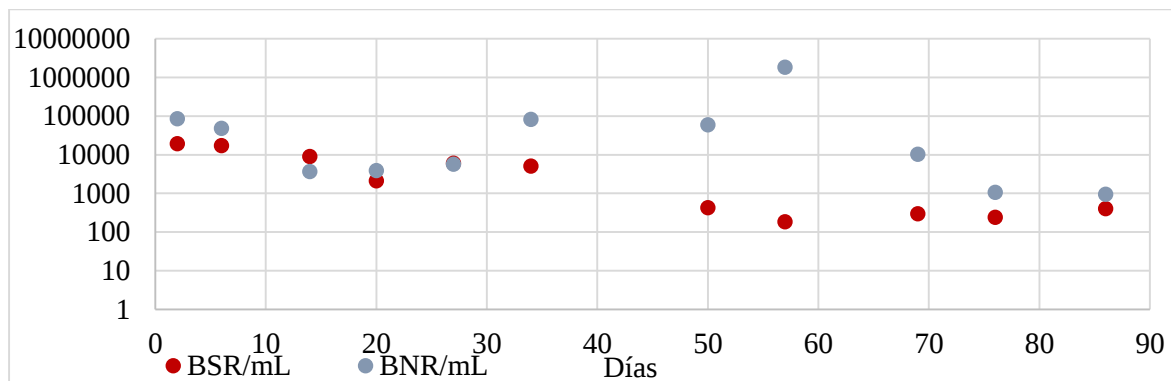


Figura 7. Conteo bacteriano para R3.



Figura 8. Fotografías registradas el día 69 de operación para R3 a la altura de la salida del reactor.

Este fenómeno había sido reportado por operarios en el campo, donde mencionan haber visto telas similares presentes en las tuberías. Sin embargo, no se había observado en la operación de los biorreactores a escala laboratorio de los estudios previos en el ICP. Debido a que este es el primer estudio con biorreactores realizado con aguas de inyección tomadas directamente de campo, suministradas al sistema sin esterilizar y a que el comportamiento de R3 sale de tendencia, éste no será analizado a mayor profundidad. Cabe destacar que no se atribuye esto a una mala operación de los reactores ya que se llevaron controles de flujo, temperatura y pH. El control de pH para este sistema se muestra en el Apéndice D.

4.2 Comportamiento de los reactores con tratamiento

4.2.1 pH y conductividad. El rango de tolerancia donde se ha demostrado que las BSR proliferan varía desde ambientes ácidos con pH de 4 hasta ligeramente alcalinos con pH de 9.5 siendo en el intervalo de 7-7,8 la condición óptima para su crecimiento (Barton y Tomei, 1995).

Como se puede observar en la Figura 9 el pH varió poco en el tiempo y se mantuvo en un rango que permite que las BSR se desarrollen, de igual forma se observó una tendencia diferenciadora entre los dos tratamientos, donde R2 presentó una tendencia ligeramente mayor en pH que R1, lo cual corresponde ya que se espera que el reactor con mayor dosificación produzca H_2S en menor cantidad, por lo tanto menor concentración de protones y un pH más alto. Este comportamiento se mantiene durante toda la operación.

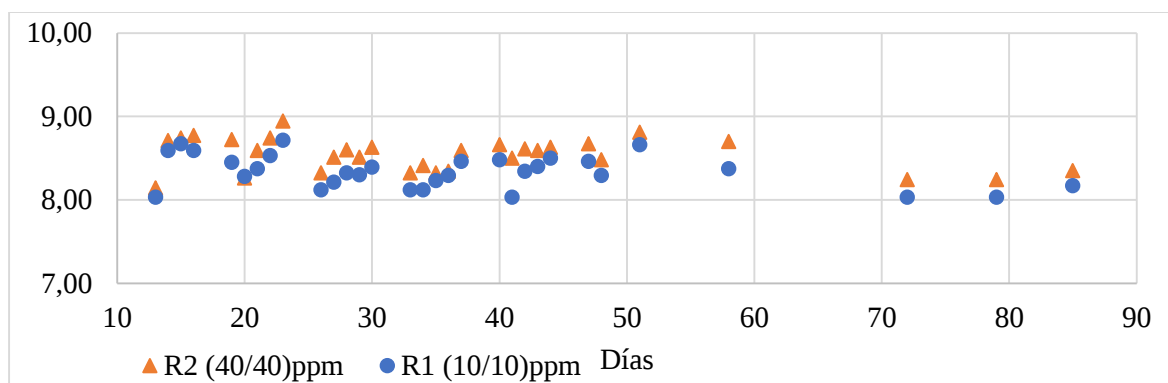


Figura 9. pH medido a la salida de los reactores durante la operación.

En las primeras tres semanas de operación en continuo el reactor R2 presentó una conductividad mayor al reactor R1 como se muestra en la Figura 10, lo cual se atribuye a que para los primeros 25 días se presentó inestabilidad en la operación de las bombas de dosificación, principalmente para R1, donde los fines de semana no se lograba una inyección estable. De igual forma se tiene en cuenta que las aguas de inyección que se alimentan a cada reactor hacen parte de los mismos lotes por lo tanto no van a tener diferencias significativas en cuanto a composición. Este parámetro fue medido únicamente hasta el día 51 debido a la disponibilidad de la sonda.

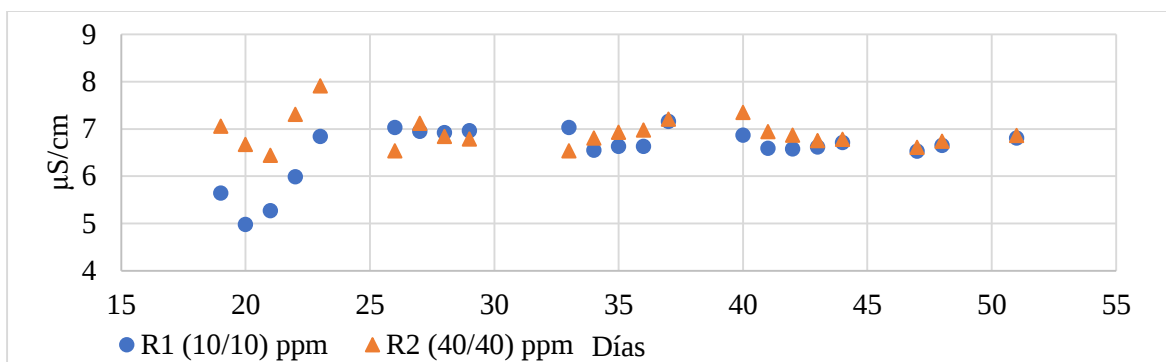


Figura 10. Conductividad medida a la salida de los reactores durante la operación.

4.2.2 Nitrato, nitrito y nitrógeno amoniacal. Se presentan a continuación las gráficas de la concentración de nitrato a la salida de los reactores R1 y R2 en la Figura 11, así como la gráfica de consumo de nitrato, el cual fue estimado teniendo en cuenta que la operación en continuo alcanza un estado de equilibrio donde se establece que la concentración a la salida representa el comportamiento dentro de los reactores. Se evidencia en la Figura 11 un comportamiento similar en los perfiles de concentración de nitrato a la salida de los dos sistemas, donde se presentan valores muy bajos a la salida de los reactores, con la mayor diferencia presentada para el día 14 de operación, pero son muy cercanos para los demás días de muestreo, lo que permite inferir que los nitratos administrados fueron consumidos dentro de los reactores y que el mayor consumo se presentó en el reactor con mayor dosificación (R2).

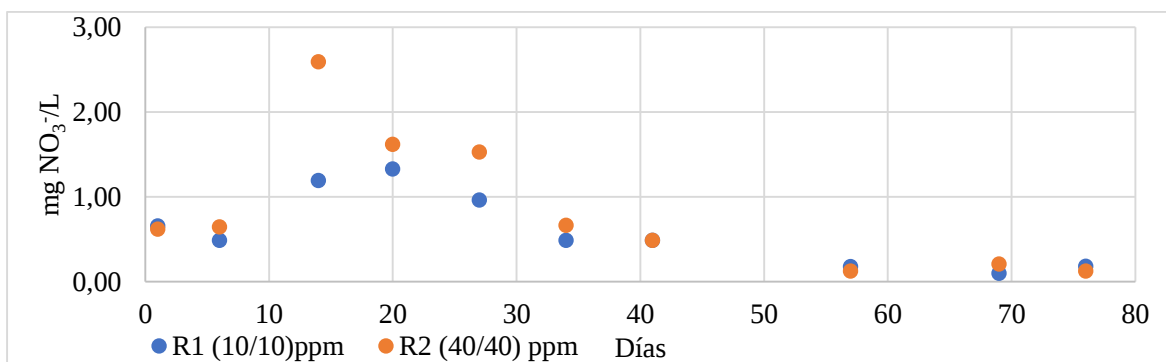


Figura 11. Concentración de iones nitrato a la salida de R1 y R2.

Los valores de consumo de nitrato se obtuvieron partiendo de la caracterización del agua de inyección para los lotes 1 y 2, con valores de 0.11 mg NO_3^-/L y 0.13 NO_3^-/L respectivamente y adicionando la solución de nitrato de sodio, la cual se calculó y preparó para obtener concentraciones a la entrada de los reactores de 10/10 ppm y 40/40 ppm según el tratamiento. Para la salida se tomaron los resultados del análisis fisicoquímico, reportados en iones de nitrato. Por lo tanto y para mantener una consistencia en el balance, las entradas fueron convertidas a esta misma unidad por lo que las concentraciones de iones de nitrato de cada tratamiento representaron 7,29 mg NO_3^-/L y 29,18 mg NO_3^-/L respectivamente. Finalmente se obtuvieron los valores de consumo presentados en la Figura 12 a partir de la diferencia entre las concentraciones de las entradas y la salida de cada reactor (la ecuación empleada para obtener estos resultados se presenta en el Apéndice E).

Se presentaron valores de consumo altos en ambos reactores durante el periodo de operación. Se muestra claramente la diferencia en la dosificación de los reactores y una tendencia de consumo constante a través del tiempo para R1 y para R2 en la Figura 12, la cual puede atribuirse a la actividad metabólica de las BNR presentes en el consorcio bacteriano que consumieron todo el nitrato disponible que ingresaba al sistema por la dosificación del tratamiento.

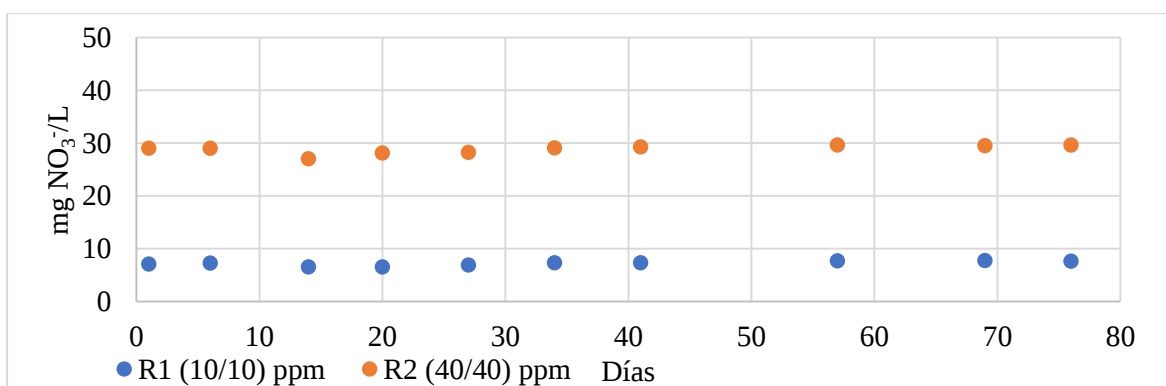


Figura 12. Consumo de iones nitrato para R1 y R2.

Las concentraciones de iones nitrito a la salida fueron medidas a la salida de los reactores R1 y R2 como se muestra en la Figura 13, respaldado en estudios anteriores donde se atribuye la inhibición de la reducción de sulfuro a la reducción del nitrato por las BNR (Callbeck, C. M. et al., 2001; Reinsel, M. A. et al., 1996).

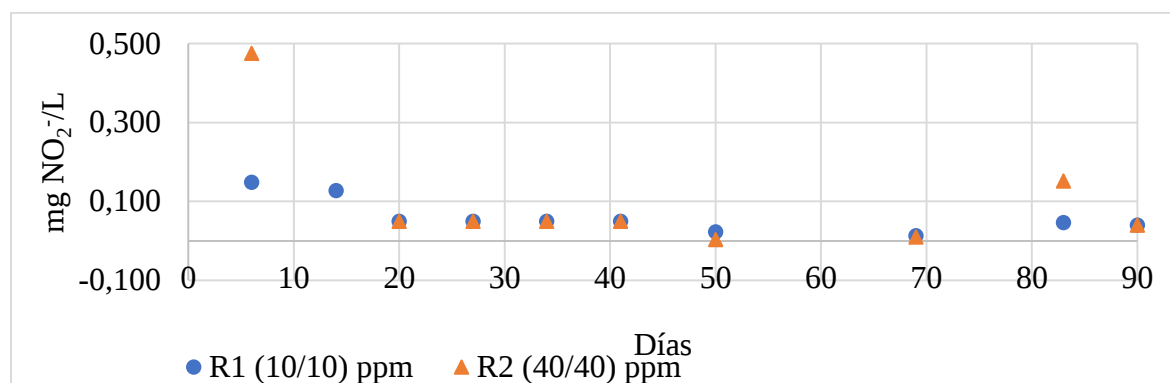


Figura 13. Concentración de iones nitrito a la salida de R1 y R2.

Las concentraciones a la salida de los reactores resultaron ser bastante bajas por lo que se puede presumir que las BNR continuaron su metabolismo hasta llegar a nitrógeno molecular haciendo uso de los ácidos orgánicos disponibles (Eckford y Fedorak, 2002), este comportamiento se mantuvo para toda la operación salvo para el primer muestreo donde la concentración en R2 supera ligeramente la presentada en R1, a partir de allí ambos sistemas presentaron un comportamiento similar en el tiempo. Sin embargo, cabe resaltar que debido a que no se midieron altas concentraciones de nitrito en el agua de inyección antes del tratamiento (< 0.015 mg NO₂⁻/L) el consumo va a ser proporcional a la dosificación que fue administrada en cada sistema, las cuales, en unidades de iones de nitrito representan 6.67 mg NO₂⁻/L y 26.67 mg NO₂⁻/L para R1 y R2 respectivamente, por lo que se estima que hubo un mayor consumo para el reactor R2.

De igual forma se midió el nitrógeno amoniacal a la salida de los reactores, para tener el seguimiento de la ruta metabólica que estaría tomando el nitrato dentro de los sistemas de

biocompetencia, donde el nitrógeno amoniacal es el resultado de metabolizar por completo los iones nitrato (Gieg, Jack y Foght, 2001). Las concentraciones de nitrógeno amoniacal se presentan en la Figura 14, donde se puede observar que las concentraciones no variaron respecto a las de entrada obtenida a partir de la caracterización del agua de inyección. Debido a que no se observan variaciones significativas para esta medición ni una tendencia diferenciadora para los dos sistemas se infiere que la producción de nitrógeno amoniacal es muy baja y que como se mencionó anteriormente las BNR pueden estar metabolizando el nitrato directamente hasta nitrógeno molecular.

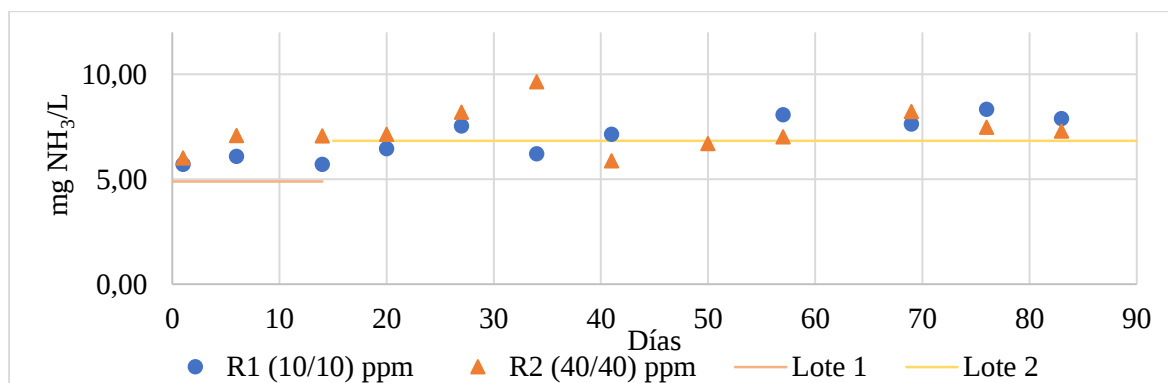


Figura 14. Concentración de nitrógeno amoniacal a la salida de R1 y R2.

4.2.3 Sulfato y sulfuro de hidrogeno. A continuación, se presenta la Figura 15 donde muestra la concentración de iones de sulfato a la salida de los reactores, donde se puede evidenciar que el reactor con la menor dosificación del tratamiento de nitrato/nitrito (R1) presenta menor concentración de sulfato a la salida respecto a la concentración en la alimentación (agua de inyección), lo cual se atribuye al consumo de sulfato que realizan las BSR al llevar a cabo su metabolismo.

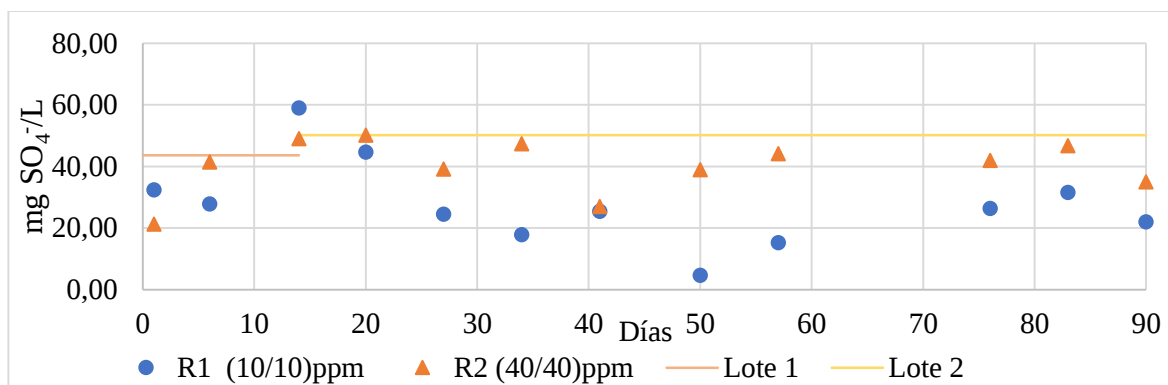


Figura 15. Concentración de iones sulfato a la salida de R1 y R2.

Los consumos de nitrato y sulfato se relacionan entre ellos y a su vez con la concentración de sulfuro a la salida de los reactores, de forma que, a menor consumo de sulfato, por parte de las BSR, se obtienen menores cantidades de H_2S como resultado de la actividad metabólica. Esto se evidencia en la Figura 16, que presenta la producción de sulfuro a través del tiempo, donde los dos reactores al principio presentan un comportamiento similar, divergiendo a partir del día 27 aproximadamente. En el reactor R1 (10/10) ppm con menor dosificación de nitrato/nitrito, se presentó mayor consumo de sulfato, lo que resultó en la mayor producción de sulfuro como se puede evidenciar para los días 21 a 51 de operación, donde un comportamiento decreciente para el perfil de sulfato en R1 corresponde con un comportamiento creciente para las concentraciones de sulfuro en el mismo período de tiempo. Esto indica un aumento en la actividad de las BSR la cual posteriormente se mantuvo sobre el tiempo, lo que se infiere a partir del comportamiento estable de las concentraciones de H_2S que se mantuvieron cercanas a 5 ppm. En cambio, para R2, operado con una dosificación mayor de nitrato/nitrito (40/40) ppm, se obtuvo un menor consumo de sulfato (Figura 15) con concentraciones de sulfato muy cercanas a las obtenidas de la caracterización del agua de alimentación, lo cual se correlaciona con menor producción de sulfuro que se mantiene sobre el tiempo cercana a las 2 ppm y es menor a R1. Por lo tanto, se logró una inhibición del consumo de sulfato y por ende de la producción de H_2S para el sistema que tenía

una dosificación de 40/40 ppm de nitrato/nitrito, la cual se prolongó durante los 3 meses de operación en continuo, mientras que la dosificación de 10/10 ppm no fue suficiente para estimular la biocompetencia al grado en que se inhibe la actividad metabólica de las BSR. Esto concuerda con estudios realizados previamente, como el caso de tratamiento con nitrato de calcio empleado por Statoil en los pozos de Gullfaks, donde se logró con la adición de 40 ppm de nitrato, disminuir los recuentos de BSR, los contenidos de H_2S en el agua de inyección y por ende las tasas de corrosión del campo tratado (Augustinovic, Z. et al., 2012). Adicionalmente, otro estudio en el que se emplearon biorreactores de flujo continuo con arena empacada y agua de mar sintética mostró que una concentración de 42.5 ppm de nitrato en el medio de alimentación al reactor logró disminuir las concentraciones de H_2S a la salida del reactor de 15 ppm a 2 ppm aproximadamente, así como disminuir la cantidad de BSR activas y presentes dentro del reactor (Myhr, S. et al., 2002).

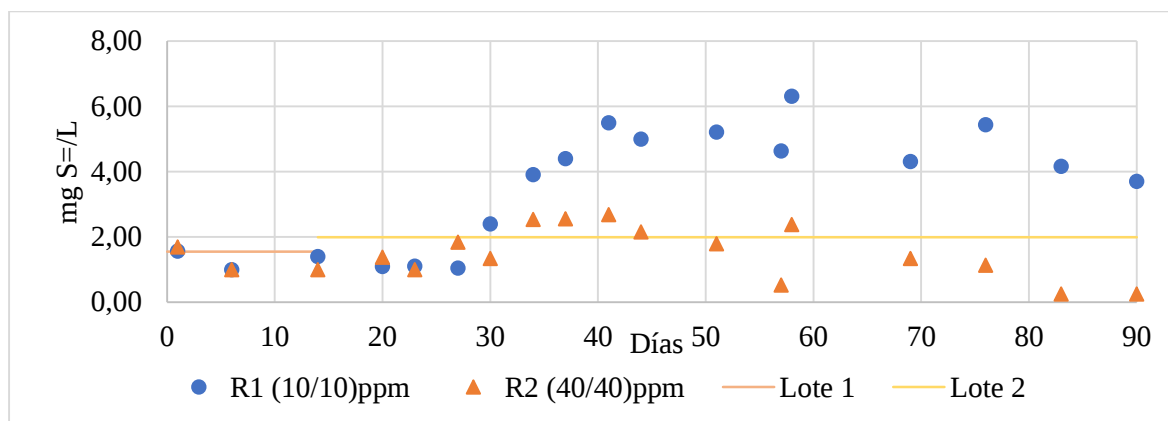


Figura 16. Concentración de H_2S a la salida de R1 y R2.

4.2.4 Carbonato y bicarbonato. No se detectaron concentraciones de carbonato en el agua de inyección, sin embargo, se observa un aumento de la presencia de éstos dentro de los reactores. La Figura 17 representa la concentración de carbonatos y bicarbonatos a la salida del sistema.

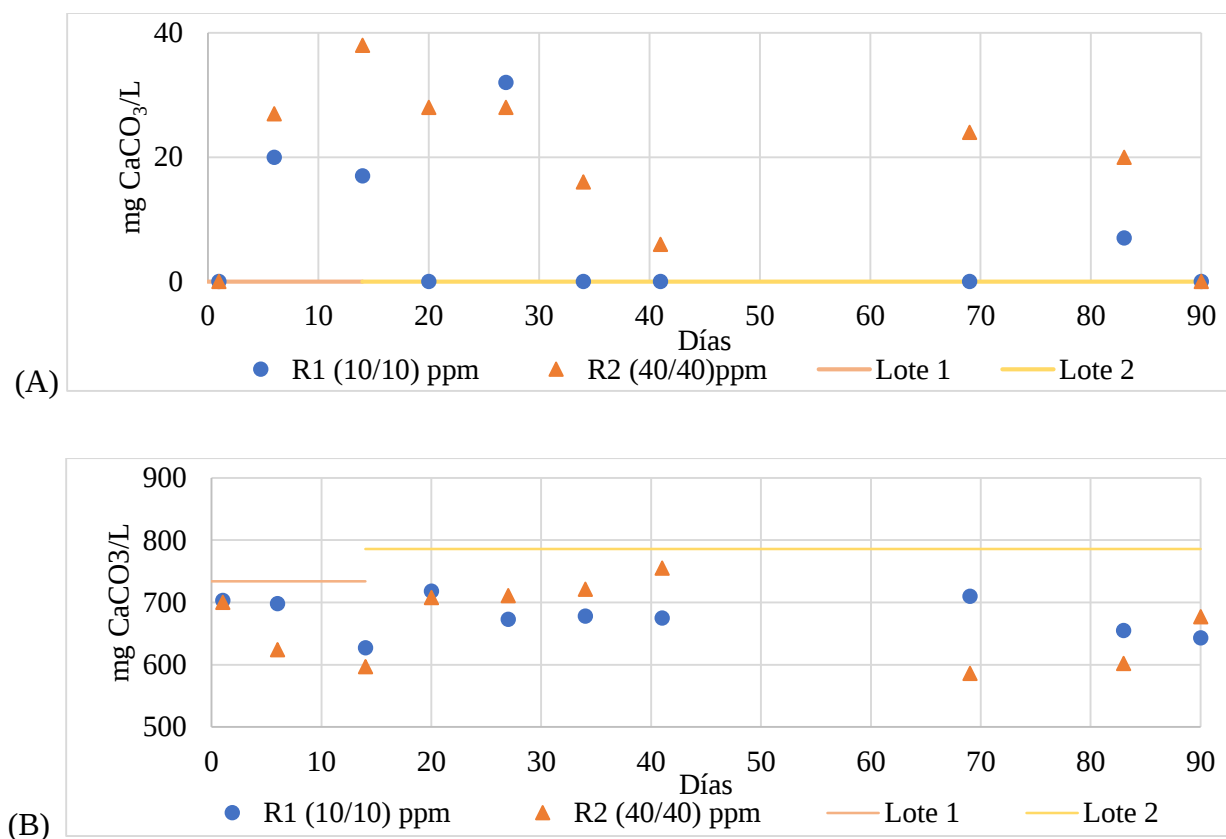


Figura 17. (A) Concentración de carbonato y (B) bicarbonato a la salida de R1 y R2.

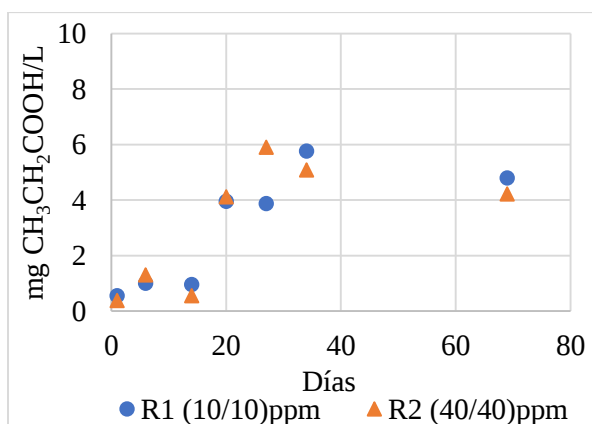
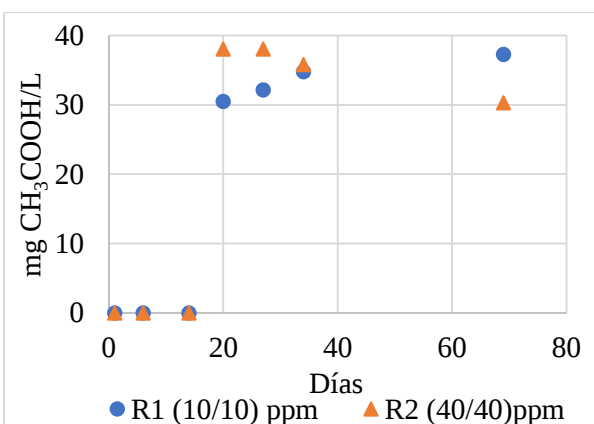
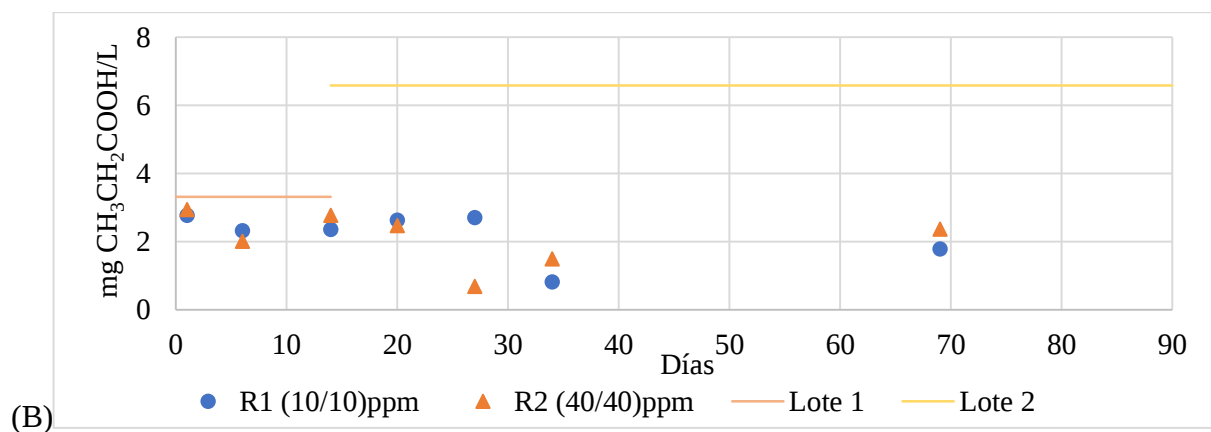
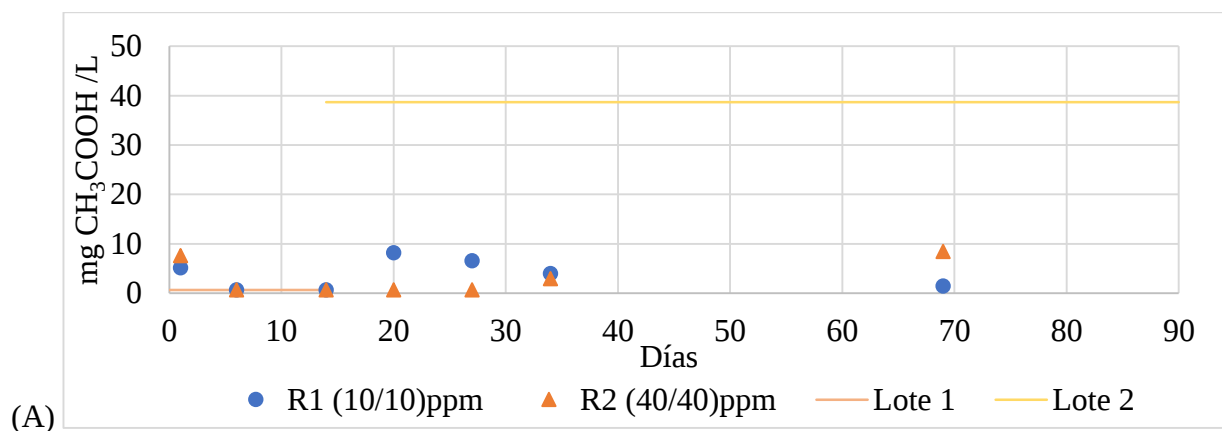
El aumento en la concentración de carbonato se puede atribuir a la conversión de iones bicarbonato a carbonato (Fuentes y Peña, 2007). Se evidencian como ligeras disminuciones en la concentración de bicarbonato (respecto a los valores de los lotes) implican un aumento en concentraciones de carbonatos para un mismo día, especialmente para R2; lo cual se puede observar para el día 6 que corresponde a un aumento en la concentración de carbonatos respecto al punto del muestreo anterior (de 0 ppm el día 1 a 27 ppm) y de igual forma una disminución en el perfil de bicarbonatos (de 700 ppm el día 1 a 624 ppm). Esto se puede constatar igualmente para el día 14 de operación donde los carbonatos aumentan en R2 hasta 38 ppm y los bicarbonatos siguen disminuyendo hasta llegar a 597 ppm. Este comportamiento se presenta principalmente en el R2, ya que R1 presentó valores de carbonatos bajos a lo largo de la operación, salvo variaciones puntuales en algunos días. La variabilidad se puede atribuir a la alta presencia de iones en las aguas

de inyección empleadas, entre otras sustancias, que pueden alterar fácilmente el equilibrio electroquímico en el sistema y generar picos como el presentado el día 50 de operación para R2 o el día 27 de operación por R1.

4.2.5 Ácidos orgánicos. Se cuantificó a la salida de los reactores la concentración de ácido acético (Figura 18A), ácido propiónico (Figura 18B), ácido butírico y ácido valérico, de los cuales solo los primeros dos presentaron variación, la cual se atribuye a la actividad metabólica de las poblaciones dentro de los reactores, por lo cual para éstos se presentan las gráficas de concentración de cada ácido medidas a la salida de cada sistema y una gráfica de consumo en el tiempo en la Figura 18 a continuación. Los perfiles del ácido butírico y el ácido valérico se mantuvieron a la misma concentración (0.86 ppm y 1.1 ppm respectivamente) por lo cual se encuentran en el Apéndice C y D respectivamente.

Se observa un mayor consumo de ácido acético que de ácido propiónico, lo cual se puede atribuir a que en ambos reactores predomina la población de BNR, las cuales están en capacidad de tomar ácido acético, propiónico o butírico para reducir los nitratos, mientras que las BSR tienen preferencia por de ácido propiónico y no tienden a asimilar el ácido acético (Grigoryan, A. A. et al., 2008). En este caso, debido a la ventaja energética que tienen BNR en cuanto a su metabolismo se estima que consumieron en su mayoría el ácido disponible, disminuyendo los donadores de electrones disponibles para las BSR (Callbeck, C. M. et al., 2001; Grigoryan, A. A. et al., 2008). Debido a que se evidencia un consumo de ácidos orgánicos volátiles se puede asegurar que efectivamente se desarrolló actividad bacteriana dentro de los 2 sistemas de reacción durante su operación. A su vez, se puede inferir que el efecto de inhibición de la producción de H_2S en R2 se debe al consumo preferencial de los ácidos orgánicos por parte de las BNR que superan a las BSR en rendimiento energético, mientras que para el sistema R1 al tener menor dosificación de nitrato

no fue tan efectiva esta competencia por los donadores de electrones, por lo cual no se impidió a las BSR llevar a cabo su metabolismo hasta el punto de producir concentraciones de H_2S mayores (Eckford y Fedorak, 2002)



(C)

(D)

Figura 18. (A) Concentración de ácido acético (CH_3COOH) a la salida de R1 y R2. (B) Concentración de ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) a la salida de R1 y R2. (C) Consumo de ácido acético (CH_3COOH) para R1 y R2. (D) Consumo de ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) para R1 y R2.

4.2.6 Comportamiento microbiológico. Respecto al seguimiento de las poblaciones bacterianas dentro del reactor se deben tener en cuenta las proporciones iniciales que presentaban las BSR y BNR. En ese mismo orden de ideas se realizó un conteo por PCR el día anterior al inicio de la operación en continuo con el fin de cuantificar las bacterias al final del periodo inicial de poblamiento del reactor (R2 con 49423 BSR/mL y 29828 BNR/mL; R1 con 140018 BSR/mL y 7517 BNR/mL). Estos resultados arrojaron una proporción BSR/BNR de 19:1 para R1, 2:1 para R2. A continuación, en la Figura 19 se presentan las gráficas de los conteos bacterianos para los 2 reactores a lo largo de la operación.

Se observa en la figura anterior una caída paulatina a través del tiempo de los conteos bacterianos, principalmente para la población de BSR, llegando hasta conteos de 10^2 . Debido a que se presentó de forma similar en los 2 biorreactores se puede atribuir a algún elemento o compuesto presente en el agua de inyección, posiblemente a residuales de biocidas que se aplican en campo, los cuales no son específicos para ninguna población, y que pudieron afectar a los consorcios que habitan dentro de los reactores afectando más significativamente a las BSR que se encontraban en menor cantidad, o a la alta permeabilidad de la arena que no permite la correcta adhesión de las bacterias y que también explicaría las disminuciones en los conteos de BNR en ambos sistemas.

Al analizar el comportamiento bacteriano a través del tiempo en las gráficas, se observa que las BNR predominan en todos los reactores, por lo tanto, se establecieron las proporciones de las

poblaciones bacterianas, en este caso empleando un promedio de los último tres muestreos, para analizar la influencia que tuvo la estimulación de la biocompetencia. Se halló una relación de BSR/BNR de 1:107 para R1 y 1:253 para R2, lo cual evidencia la estimulación lograda para las BNR para los reactores R1 y R2 con el tratamiento de dosificación de nitrato/nitrito, donde la mayor proporción bacteriana para R2 corresponde con las concentraciones más altas. A su vez la siguiente escala en dosificación que fue el reactor R1 con 10/10 presenta la segunda proporción más alta con una diferencia representativa entre ambas.

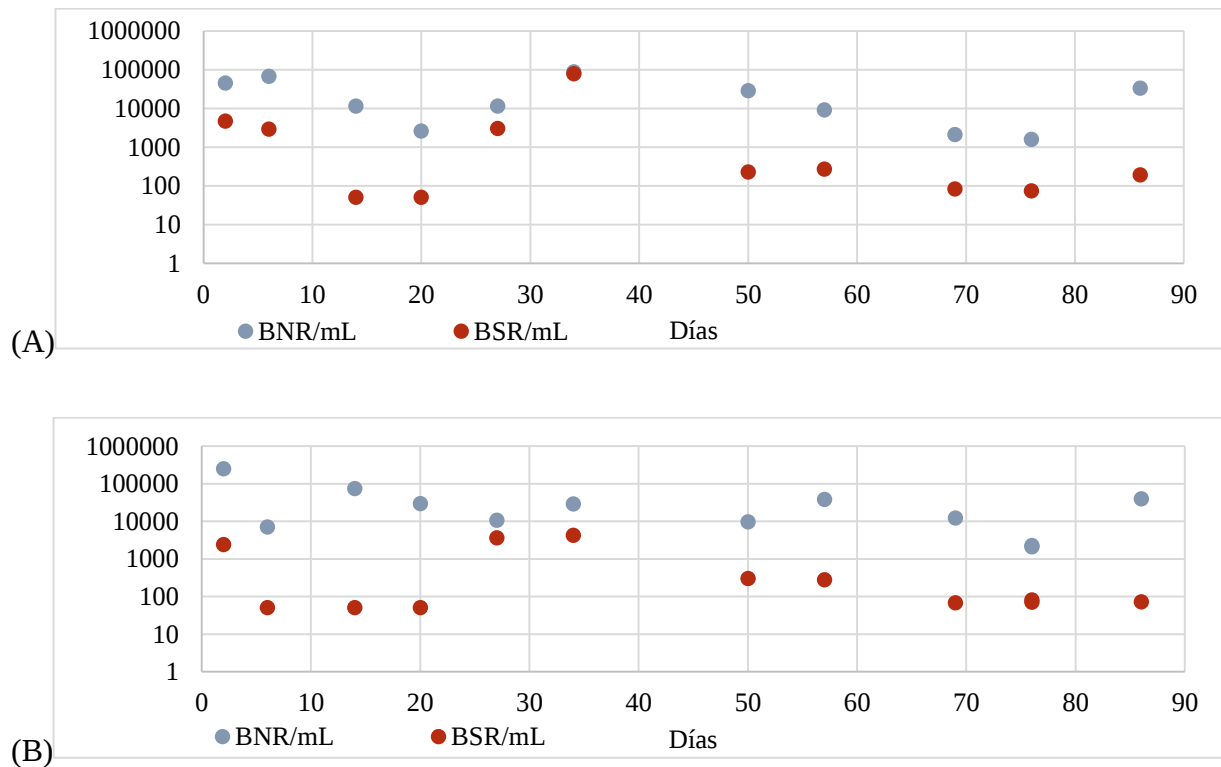


Figura 19. (A) Conteo bacteriano a la salida de R1. (B) Conteo bacteriano a la salida de R2.

Los resultados del seguimiento de la prueba de diluciones realizada a partir del día absorbancia para la dilución 10E-1 se muestran en la Figura 20.

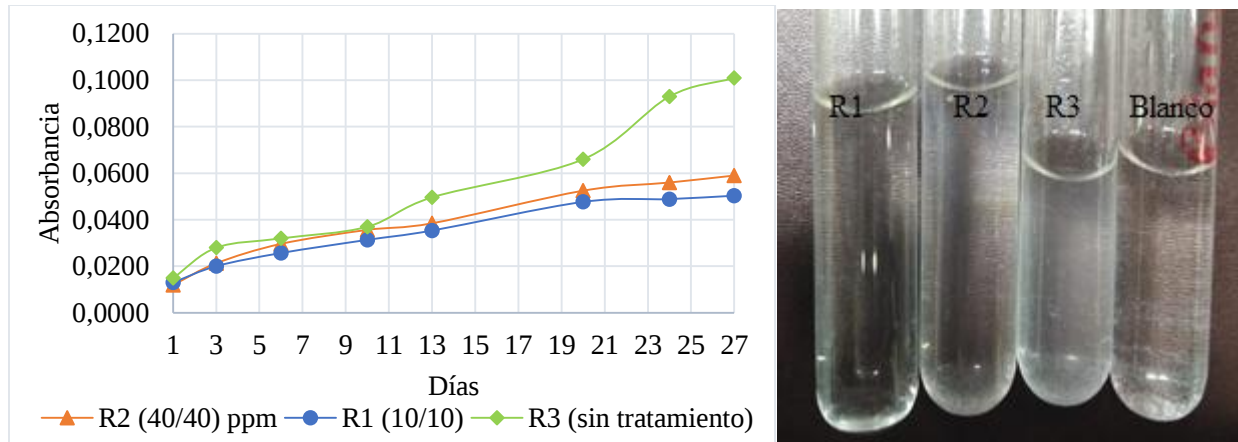


Figura 20. (A) Absorbancia medida para el tubo de dilución 10E-1 en el tiempo para los reactores R1, R2 y R3. (B) Fotografía de los tubos de la dilución 10E-6 para el día 27.

Se observa que el reactor R3 presenta una clara diferencia en la tendencia en cuanto al crecimiento siendo el que predomina y muestra valores más altos de absorbancia en el tiempo, adicionalmente se muestran los tubos de la dilución 1E-6 donde se observa el mayor crecimiento bacteriano en el tubo del reactor R3 asociado con la turbidez presentada, mientras los otros dos tubos correspondientes a R1 y R2 presentan mayor transparencia, es decir, muestran un crecimiento celular menor. Se puede evidenciar que la población de BSR presente en el reactor R3 creció más rápidamente debido al medio Starkey que las favorece, lo cual indica que dentro de este reactor sin tratamiento habían más BSR con el metabolismo del sulfato activo. En contraste, para los reactores en donde fue adicionado el tratamiento, R1 y R2, la población mostró un crecimiento más lento y similar entre ellos, lo cual se infiere que es debido al efecto inhibitorio en el metabolismo que pueden presentar las poblaciones donde se estimula la biocompetencia. Adicionalmente, R2 mostró una tendencia ligeramente mayor a R1, esto probablemente debido a que sus conteos bacterianos fueron ligeramente más altos que R1 a lo largo de la operación.

5. Conclusiones

Durante los 3 meses de ejecución del proyecto se lograron mantener estables las condiciones de operación mediante el correcto diseño e implementación de un montaje de 3 reactores de arena empacada, de flujo ascendente alimentado con agua de inyección, siendo esta la primera vez que un montaje de este tipo le es suministrado agua de inyección del pozo sin esterilizar, lo cual permitió evaluar con mayor cercanía el comportamiento microbiológico y la respuesta de éste ante la administración en continuo de diferentes concentraciones de nitrato y nitrito de sodio, sin embargo y aunque las condiciones como presión y tiempos de residencia son claramente diferentes en el pozo se lograron ver tendencias diferenciadoras marcadas en cada uno de los tratamientos.

Se evidenció que la dosificación de 40/40 ppm de $\text{NaNO}_3/\text{NaNO}_2$ logró mantener baja la concentración de H_2S , cercana a 2 ppm, sin sobrepasar este nivel y manteniendo la tendencia en el tiempo de operación, atribuyendo así este efecto al favorecimiento de la biocompetencia. Se comprobó que, aunque en el sistema R1 de dosificación 10/10 ppm de igual manera se pudo estimular la biocompetencia, sin embargo, esta concentración no fue suficiente para lograr una inhibición de la actividad metabólica de la población BSR, ya que este reactor presento valores de hasta 6 ppm de H_2S .

Se comprobó mediante la prueba de diluciones que la población de BSR presente en el reactor R3, sin tratamiento, mostró una velocidad de crecimiento mayor que las poblaciones de los reactores R1 y R2. Esto se atribuye a que las poblaciones sometidas a tratamiento con nitrato/nitrito se encuentran inhibidas metabólicamente por lo que no pueden aprovechar el sulfato tan rápidamente, lo que significó una recuperación más lenta de estos sistemas incluso en medios que favorecen directamente el desarrollo de la población BSR.

Referencias Bibliográficas

- Augustinovic, Z., Birketveit, O., Clements, K., Freeman, M., Gopi, S., Ishoey, T., ... & Scheie, J. (2012). Microbes–oilfield enemies or allies. *Oilfield Review*, 24(2), 4-17.
- Barton, L. L., & Tomei, F. A. (1995). *Biotechnology Handbooks 8-Sulfate-Reducing Bacteria*.
- Barton, L. L., & Tomei, F. A. (1995). Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In *Sulfate-reducing bacteria* (pp. 1-32). Springer, Boston, MA.
- Bradley, G., McGinley, H., & Hermsen, N. (2011, January). A global perspective on biocides regulatory issues. In *Offshore Technology Conference*. Offshore Technology Conference
- Callbeck, C. M., Dong, X., Chatterjee, I., Agrawal, A., Caffrey, S. M., Sensen, C. W., & Voordouw, G. (2011). Microbial community succession in a bioreactor modeling a souring low-temperature oil reservoir subjected to nitrate injection. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(3), 799-810.
- Cord-Ruwisch, R., Kleinitz, W., & Widdel, F. (1987). Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *Journal of Petroleum Technology*, 39(01), 97-106.
- Davidova, I., Hicks, M. S., Fedorak, P. M., & Suflita, J. M. (2001). The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 80-86.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881-890.

- Eckford, R. E., & Fedorak, P. M. (2002). Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 83-92.
- Fuentes, C., & Peña, D. (2007). Predicción de la corrosión por CO₂+ H₂S en tuberías de acero al carbono. *Scientia et technica*, 1(36).
- Gieg, L. M., Jack, T. R., & Foght, J. M. (2011). Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2(92), 263-282.
- Greene, E. A., Brunelle, V., Jenneman, G. E., & Voordouw, G. (2006). Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), 7897-7901.
- Grigoryan, A. A., Cornish, S. L., Buziak, B., Lin, S., Cavallaro, A., Arensdorf, J. J., & Voordouw, G. (2008). Competitive oxidation of volatile fatty acids by sulfate-and nitrate-reducing bacteria from an oil field in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4324-4335.
- Herbert, B. N. (1987). Reservoir souring. *Microbial Problems in the Offshore Oil Industry*, 63-71.
- Hubert, C., & Voordouw, G. (2007). Oil Field Souring Control by Nitrate-Reducing *Sulfurospirillum* spp. That Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria for Organic Electron Donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2644.
- Johnson, R. J., Folwell, B. D., Wirekoh, A., Frenzel, M., & Skovhus, T. L. (2017). Reservoir Souring–Latest developments for application and mitigation. *Journal of biotechnology*, 256, 57-67.

- Little, B., Wagner, P., & Mansfeld, F. (1992). An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochimica acta*, 37(12), 2185-2194.
- Myhr, S., Lillebø, B. L., Sunde, E., Beeder, J., & Torsvik, T. (2002). Inhibition of microbial H₂ S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(3), 400-408.
- Postgate, J. R. (1984). The sulphate-reducing bacteria. *The sulphate-reducing bacteria*.
- Potekhina, J. S., Sherisheva, N. G., Povetkina, L. P., Pospelov, A. P., Rakitina, T. A., Warnecke, F., & Gottschalk, G. (1999). Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(5), 639-646.
- Reinsel, M. A., Sears, J. T., Stewart, P. S., & McInerney, M. J. (1996). Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. *Journal of industrial microbiology*, 17(2), 128-136.
- Videla, H. A., & Herrera, L. K. (2005). Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, 8(3), 169-180.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. *Biology of anaerobic microorganisms*, 469-585.
- Xue, Y., & Voordouw, G. (2015). Control of microbial sulfide production with biocides and nitrate in oil reservoir simulating bioreactors. *Frontiers in microbiology*, 6, 1387.
- Zehnder, A. J. B. (1988). Geochemistry and biogeo-chemistry of anaerobic habitats. *Biology of anaerobic microorganisms*, 1-38.

Zuo, R., Örnek, D., Syrett, B. C., Green, R. M., Hsu, C. H., Mansfeld, F. B., & Wood, T. K. (2004). Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 275-283.

Apéndices

Apéndice A. Composición medio STARKEY

Medio STARKEY	
Compuesto	cantidad (g/L)
K₂HPO₄	0.56
NH₄CL	1.1
CaCl₂+2H₂O	0.12
Na₂SO₄	0.56
MgSO₄*7H₂O	2.2
Extracto de levadura	0.5
Lactato de Sodio	3,8 mL
Agua desionizada	1000 mL

Nota: Tomado de ECOPETROL, Manual de preparación de medios, Laboratorio de Biotecnología-ICP, 2016.

Apéndice B. Norma, método y modelo de los equipos usados para la evaluación de parámetros físicoquímicos

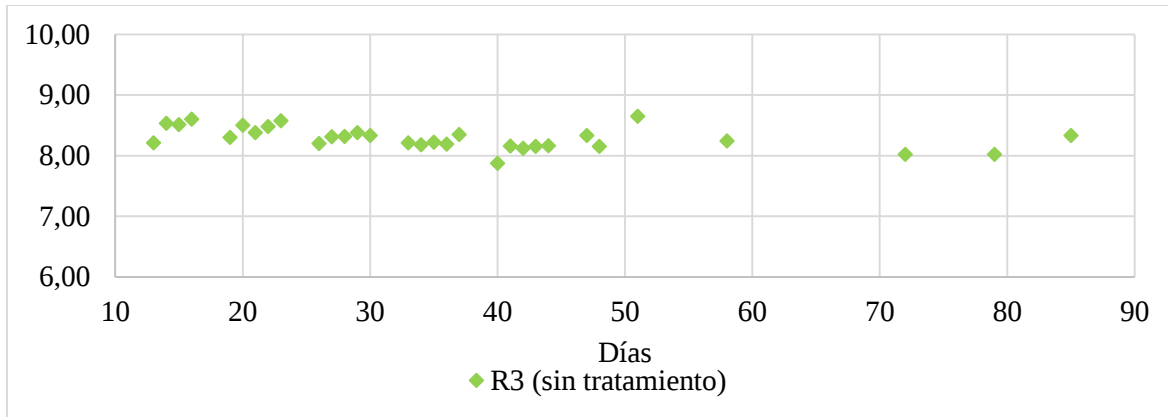
Parámetro	Equipo	Método	Norma estándar
Sulfato	Espectrofotómetro	Método turbidimétrico	Standard Methods
	Cary 8454	(mg SO ₄ -2/L)	4500 SO ₄ ⁻² E \ 2012
Sulfuro	Titulador	Método yodométrico	Standard Methods
	automático Metrohm titrando 808	(mg S ⁻² /L)	4500 – S ² F \ 2012
Cloruro	Titulador	Método	Standard Methods
	automático Metrohm titrando 808	potenciométrico (mg Cl ⁻ /L)	4500 – Cl ⁻ D \ 2012
Nitrógeno	Medidores de pH	Método	Standard Methods
amoniaco	Orion710 A Orion	potenciométrico	4500- NH ₃ B,C \
	Star A2111	(mg NH ₃ ⁻ N/L)	2012
Nitrato	Espectrofotómetro	Método fotométrico	J.Rodier Análisis de
	Cary 8454	(mg NO ₃ ⁻ N/L)	las aguas 1981
Nitrito	Espectrofotómetro	Método fotométrico	J.Rodier Análisis de
	Cary 8454	(mg NO ₂ ⁻ N/L)	las aguas 1981
Ácidos orgánicos	Cromatógrafo	(IC) (mg de ácido/L)	CLT-LAS-I-093/102
	liquido HP 1200-1		\ 2013

Carbono	Medidores de pH	(mg CO ₃ ⁻ /L)	Standard Methods
inorgánico	Orion710 A Orion	(mg HCO ₃ ⁻)	2320 A, B \ 2012
	Star A2111		

Apéndice C. Resultados de la caracterización del agua de inyección alimentada a los reactores.

Parámetro	Unidad	lote1	lote 2
pH / T (GR C)	Unid. pH	8,27	8,06
CARBONATOS	mg CaCO ₃ /L	0	0
BICARBONATO	mg CaCO ₃ /L	734	786
NITRATO	mg NO ₃ -N/L	0.11	0,13
NITRITO	mg NO ₂ -N	0.015	0.015
SULFURO	mg S=/L	1.55	1.99
SULFATO	mg SO ₄ =/L	43.6	50.2
CLORURO	mg Cl-/L	1857	2277
NITROGENO AMONiacal	mg NH ₃ -N/L	4.9	6.83
ÁCIDOS CARBOXILICOS			
ÁCIDO FÓRMICO	mg/L	0.36	0.36
ÁCIDO ACÉTICO	mg/L	0.65	38.7
ÁCIDO PROPIÓNICO	mg/L	3.32	6.59
ÁCIDO BUTÍRICO	mg/L	0.86	0.86
ÁCIDO VALÉRICO	mg/L	1.1	1.1

Apéndice D. pH medido a la salida del reactor R3

Apéndice E. Balance de iones NO_3^- en el sistema.

Se plantea primero la ecuación del balance de masa para iones de nitrato en el sistema.

$$Q_E * C_E + Q_D * C_D - Q_S * C_S + R_b = \frac{d\text{NO}_3}{dt}$$

Debido a que se establece la presunción de estado estable se desprecia el término de acumulación (término dependiente del tiempo).

$$Q_E * C_E + Q_D * C_D - Q_S * C_S + R_b = 0$$

De igual forma debido a que se cuenta con un flujo de 1.8 mL/min tanto para la entrada como salida de los reactores se toma este valor como una referencia para el consumo, presentado en concentraciones las cuales representan la variación de iones nitrato entre la entrada y la salida de los reactores. Esta variación se relaciona con el consumo producto de la actividad metabólica de las BNR. La ecuación resultante se presenta a continuación:

$$\frac{R_b}{Q} = C_E + C_D - C_S$$

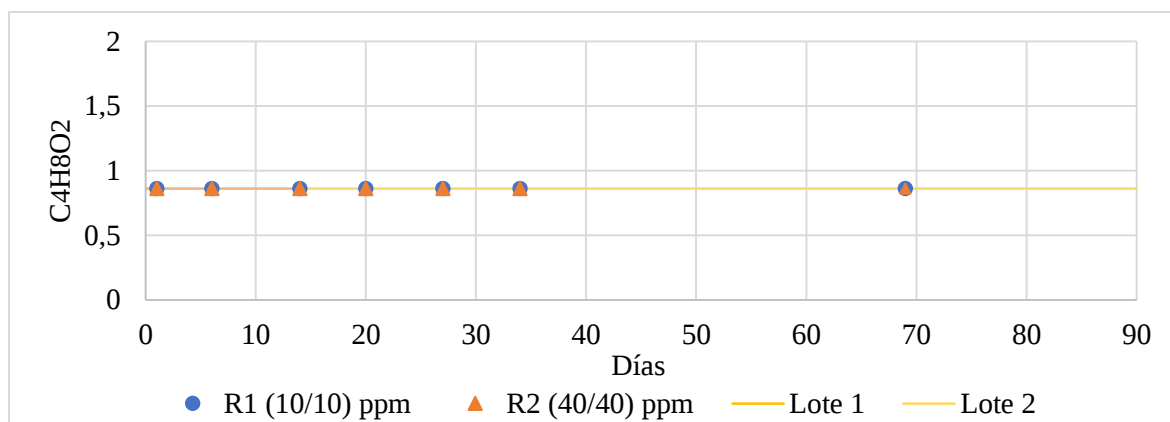
C_E = Concentración agua de inyección caracterizada

C_D = Concentración de dosificación administrada

C_S = Concentración a la salida del sistema

Donde el término de izquierda corresponde al consumo que depende del flujo , mientras el término a la derecha de la ecuación corresponde a las concentraciones de entrada del agua de inyección, de dosificación del tratamiento de nitrato y de salida del sistema.

Apéndice F. Concentración de ácido butírico a la salida de R1 y R2.



Apéndice G. Concentración de ácido valérico a la salida de R1 y R2.

