

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

**PRODUCCIÓN DE METABOLITOS A PARTIR DE UN CULTIVO
MIXTO PROVENIENTE DE UN CRUDO MEXICANO**

TESIS

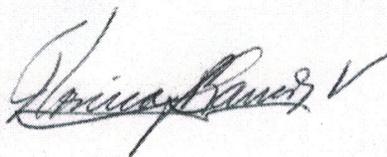
Que para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I.B.I María Gabriela Cesatti Hernández

Director de tesis:

Dra. Florina Ramírez Vives



Asesores:

Dr. Óscar Monroy Hermosillo

Dra. Patricia Olguín Lora

Marzo 2012

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

México D.F. a 23 de Marzo del 2012

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis.

**PRODUCCIÓN DE METABOLITOS A PARTIR DE UN CULTIVO MIXTO
PROVENIENTE DE UN CRUDO MEXICANO**

Presentó

María Gabriela Cesatti Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dra. Florina Ramírez Vives

Asesor: Dr. Óscar Monroy Hermosillo

Asesor: Dra. Patricia Olguín Lora

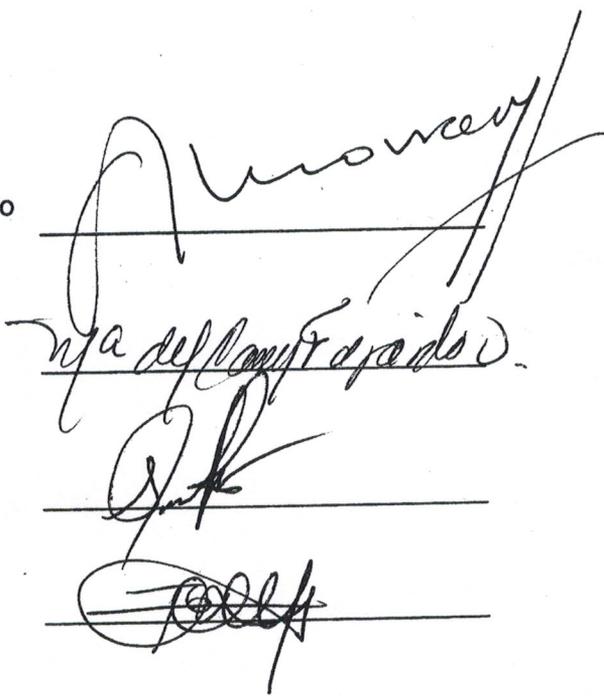
Jurado:

Presidente: Dr. Óscar Armando Monroy Hermosillo
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario: Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz
Universidad Autónoma Metropolitana

Vocal: Dra. Patricia Olguín Lora
Instituto Mexicano del Petróleo

Vocal: Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo
Instituto Mexicano del Petróleo



A mi madre Ma. Eugenia Hernández por impulsarme a seguir adelante en los momentos de flaqueza con todo su amor, apoyo y comprensión. Por ser más que abuela para mi mayor tesoro.

A mi hija Mariana por ser mi mayor alegría y mi más grande aliciente, porque a su corta edad me ha dado grandes sorpresas; por acompañarme a altas horas de la noche aún cuando sus ojos se cerraban de sueño.

A mis suegros Sara e Isidro por todo su apoyo incondicional.

A Agustín, con todo mi amor, gracias por estar conmigo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros y amigos del laboratorio W-106. En especial a Lalo, Mario, Carlos y Alejandro, por todo su apoyo y comprensión.

A la Dra. Florina por su apoyo incondicional y por sus asesorías en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Óscar, a la Dra. Carmen, a la Dra. Patricia Olgún y a la Dra. Tere Roldán por todas sus atinadas correcciones y por su participación en el jurado de esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición y composición del Petróleo.....	1
1.1.1 Hidrocarburos alifáticos.....	1
1.1.2 Hidrocarburos aromáticos.....	2
1.1.3 Hidrocarburos polares o resinas.....	2
1.1.4 Asfaltenos.....	2
1.2 Clasificación del petróleo.....	3
1.3 Recuperación del petróleo.....	4
1.3.1 Recuperación primaria.....	4
1.3.2 Recuperación secundaria.....	4
1.3.3 Recuperación terciaria.....	4
1.3.3.1 Recuperación Mejorada de Petróleo por Actividad Microbiana (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR).....	5
1.3.3.1.1 Mecanismos de la recuperación de petróleo por vía microbiana (MEOR).....	5
1.4 Características de los yacimientos.....	7
1.5 Microorganismos presentes en los yacimientos de petróleo.....	8
1.5.1 Microorganismos Extremófilos.....	10
1.5.1.1 Microorganismos halófilos.....	10
1.6 Biodegradación de hidrocarburos.....	12
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo General.....	16
4.2 Objetivos Específicos.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Inóculo.....	18
5.2. Medio de cultivo.....	18
5.2.1 Preparación del medio de cultivo.....	18
5.2.2 Solución de minerales.....	19
5.2.3 Solución de melaza.....	19
5.3 Enriquecimiento del cultivo mixto.....	19
5.3.1 Primer cultivo de enriquecimiento.....	20
5.3.2 Segundo cultivo de enriquecimiento.....	20
5.3.3 Tercer cultivo de enriquecimiento.....	20
5.4 Prospección de producción de metabolitos por el cultivo mixto.....	21
5.5 Caracterización cinética del cultivo mixto.....	21
5.6 Evaluación del cambio en las propiedades del crudo con el cultivo mixto.....	21
5.6.1 Condiciones de la prueba.....	22
5.6.2 Muestreo.....	22
5.7 Técnicas analíticas.....	22
5.7.1 Cuantificación de microorganismos viables.....	22
a) Preparación de las diluciones.....	23
b) Preparación de placas.....	23
5.8 Medición del enriquecimiento microbiano de los cultivos de enriquecimiento.....	23
5.9 Tinción de Gram.....	24
5.10 Microscopía electrónica.....	24
a) Reactivos.....	24

.....	
b) Procedimiento para preparación de la muestra a observar..	24
.....	
5.11 Cuantificación de CO ₂	25
5.12 Cuantificación de proteínas.....	25
a) Reactivos.....	25
.....	
b) Preparación de la curva estándar.....	26
c) Preparación de las muestras.....	26
5.13 Consumo de sustrato.....	27
a) Reactivos.....	27
.....	
b) Preparación de la curva estándar.....	27
c) Preparación de las muestras	27
.....	
5.14 Cuantificación de solventes y ácidos.....	28
a) Preparación de la curva estándar.....	28
b) Preparación de las muestras.....	28
.....	
5.15 Tratamiento de resultados para la obtención de parámetros cinéticos.....	29
5.16 Contenido de hidrocarburos totales.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
6.1 Obtención del cultivo mixto proveniente de una muestra de petróleo.....	31
6.1.1 Caracterización morfológica del cultivo mixto aislado de una muestra de petróleo.....	32
6.1.1.1 Observación macroscópica.....	32
6.1.1.2 Observación microscópica en fresco y con tinción de Gram.....	32
6.1.1.3 Observación al microscopio electrónico de barrido.....	34
6.1.1.4 Identificación de los metabolitos producidos por el cultivo mixto en el tercer enriquecimiento.....	34
6.2 Caracterización cinética del cultivo mixto.....	36
6.2.1 Consumo de sustrato.....	36
6.2.2 Producción de metabolitos.....	38
6.2.3 Determinación de parámetros cinéticos.....	39
6.3 Efecto del cultivo mixto sobre las características del crudo.....	43
6.3.1 Biomasa.....	43
6.3.2 Producción de metabolitos.....	44
6.3.3 Cambio en la composición del aceite crudo después de cada uno de los tratamientos.....	46
7. CONCLUSIONES	53
8. RECOMENDACIONES	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55
10. ANEXOS	63
1. Curvas patrón de solventes.....	63
2. Curvas patrón de ácidos.....	64
3. Curva patrón de sacarosa.....	66

4. Curva patrón de proteína.....	66
4.1 Curva patrón de proteína en función de la absorbancia.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de clasificación del petróleo.....	3
Tabla 2. Microorganismos productores de solventes, ácidos y gases y su efecto en el yacimiento.....	6
Tabla 3. Microorganismos aislados de muestras de petróleo.....	9
Tabla 4. Microorganismos utilizados en el proceso MEOR y funciones.....	10
Tabla 5. Microorganismos aislados de diferentes tipos de muestras con diferentes concentraciones de NaCl utilizadas.....	12
Tabla 6. Medio de cultivo utilizado para microorganismos fermentadores.....	17
Tabla 7. Solución de minerales.....	18
Tabla 8. Tratamientos realizados para evaluar el cambio en las propiedades del crudo mixto aislado.....	21
Tabla 9. Crecimiento microbiano en cada uno de los enriquecimientos para la obtención del cultivo mixto.....	30
Tabla 10. Morfología colonial y microscópica de las colonias obtenidas del cultivo mixto, provenientes del aceite crudo.....	32
Tabla 11. Velocidades de consumo de sustrato del cultivo mixto con diferentes concentraciones de sustrato.....	36
Tabla 12. Parámetros cinéticos del cultivo mixto con una concentración de NaCl 0.85 M.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de algunos compuestos que se obtienen al fraccionar al petróleo.....	3
Figura 2. Proceso de recuperación de hidrocarburos. (a) Recuperación secundaria por inyección de agua, (b) Proceso de recuperación terciaria o MEOR, por inyección de nutrientes para estimular a los microorganismos autóctonos del yacimiento.....	7
Figura 3. Estrategia experimental seguida durante los experimentos.....	16
Figura 4. Consumo de sacarosa por el cultivo mixto.....	28
Figura 5. Velocidad de consumo de sacarosa en función de su concentración, por el cultivo mixto.....	29
Figura 6. Colonias formadas por el cultivo mixto en medio sólido.....	3 2
Figura 7. Micrografía de células Gram positivas (rosas) y Gram negativas (violetas) presentes en el cultivo mixto.....	3 2
Figura 8. Micrografías del cultivo mixto proveniente de una muestra de petróleo. a) bacilos y cocos y b) bacilos.....	33
Figura 9. Metabolitos producidos por el cultivo mixto en el tercer enriquecimiento con diferentes concentraciones de sacarosa.....	3 4
Figura 10. Crecimiento del cultivo mixto con diferentes concentraciones de sustrato.....	3 5
Figura 11. Consumo de sustrato por el cultivo mixto microbiano con diferentes concentraciones de sustrato.....	3 6
Figura 12. Producción de etanol con diferentes concentraciones de sustrato.	37
Figura 13. Producción de CO ₂ con diferentes concentraciones de sustrato.....	3 8
Figura 14. Velocidad de crecimiento del cultivo mixto en función de la concentración de sustrato.....	39
Figura 15. Velocidad máxima de consumo de sacarosa por el cultivo mixto, para la obtención de $q_{m\acute{a}x}$ y k_s	4 0
Figura 16. Velocidad de producción de etanol por el cultivo mixto.....	40
Figura 17. Velocidad de producción de CO ₂ por el cultivo mixto.....	41
Figura 18. Crecimiento microbiano en cada uno de los tratamientos.....	43
Figura 19. Producción de ácido acético en los dos tratamientos del crudo (A) y producción de etanol en el tratamiento 1 (B).....	45

Figura 20. Hidrocarburos totales del aceite crudo original, los dos tratamientos y el control.....	4 6
Figura 21. Composición de carbono del aceite crudo original, los dos tratamientos, el control.....	4 7
Figura 22. Cromatogramas de la muestra de aceite original (a) y T-1 (b)	4 9
Figura 23. Cromatogramas de la muestra de aceite original (a) y T-2 (b)	5 0
Figura 24. Cromatogramas de la muestra de aceite original (a) y Control (b)	5 1

RESUMEN

La actividad económica mundial depende del petróleo y otros combustibles fósiles ya que son la principal fuente de energía. Debido a la disminución de la producción de hidrocarburos por métodos convencionales, es necesario explorar otras alternativas que se pueden utilizar en la industria del petróleo en lugar de los métodos fisicoquímicos tradicionales, tal como la recuperación de hidrocarburos vía microbiana (MEOR), la cual además de ser eficiente, es menos costosa y tiene un menor impacto al medio ambiente.

Para poder obtener la tecnología, es necesario realizar estudios básicos, como el conocimiento de los microorganismos presentes en muestras de aceite. Este fue el caso del presente trabajo donde se obtuvo un cultivo mixto proveniente de una muestra de aceite por medio de cultivos de enriquecimiento sucesivos, utilizando un medio de cultivo para microorganismos fermentadores con una concentración de NaCl 0.85 M a 32 °C. El cultivo mixto se caracterizó macroscópicamente y microscópicamente, donde los microorganismos se presentaron en forma de cocos y bacilos (libres y formando cadena).

El cultivo mixto tuvo la capacidad de producir algunos metabolitos de interés en el proceso MEOR como ácido acético, etanol, acetona y CO₂. Para obtener algunos parámetros cinéticos del cultivo los valores experimentales de diferentes ensayos con diferentes concentraciones de sustrato fueron ajustados con el modelo de Monod. Se obtuvo una velocidad de crecimiento (μ_{max}) de 0.0348 h⁻¹, una constante de afinidad por el sustrato (k_s) de 23.29 mM, un tiempo de duplicación (t_d) de 19.91 h (0.83 d), una velocidad máxima de consumo de sustrato ($q_{m\acute{a}x\ sac}$) de 0.2295 mM/h, velocidad máxima de producción de etanol ($q_{m\acute{a}x\ etanol}$) de 0.242 mM/h y una velocidad de producción de CO₂ ($q_{m\acute{a}x\ CO_2}$) de 0.06 mM/h. Se evaluó el efecto del cultivo mixto sobre las características del aceite crudo, se obtuvo que el cultivo mixto tuvo la capacidad de biodegradar el aceite disminuyendo la concentración de hidrocarburos totales (HTP) en un 32%, los alcanos de C₈ - C₁₁ y C₁₂ - C₁₇ se redujeron en un 46 y un 31% respectivamente. Por lo que el cultivo mixto obtenido puede ser potencialmente utilizado en un proceso MEOR.

ABSTRACT

Global economic activity is dependent on oil and other fossil fuels as the main source of energy. Due to decreased production of hydrocarbons by conventional methods, it is necessary to explore other alternatives that can be used in the petroleum industry instead of the traditional physico-chemical methods, such as microbial enhanced oil recovery (MEOR), which also to be efficient, less expensive and has less impact on the environment.

In order to obtain the technology, basic studies are needed, such as knowledge of the microorganisms present in oil samples. This was the case where the present study a mixed culture was obtained from an oil sample by successive enrichment cultures using a culture medium for fermenting microorganisms at a concentration of 0.85 M NaCl at 32 °C. The mixed culture was characterized macroscopically and microscopically, where microorganisms are presented in the form of coccus and rods (free and form string).

The mixed culture was able to produce some metabolites of interest in the process MEOR such as acetic acid, ethanol, acetone and CO₂. For some kinetic parameters of the experimental cultivation of various tests with different substrate concentrations were fitted with the Monod model. Were obtained the maximum growth rate ($\mu_{max}=0.0348 \text{ h}^{-1}$), a substrate affinity constant (k_s) of 23.29 mM, $t_d=19.91 \text{ h}$ (0.83 d), a maximum rate of substrate consumption ($q_{max \text{ sac}}$) of 0.2295 mM/h, a maximum rate of ethanol production ($q_{max \text{ ethanol}}$) of 0.242 mM/h and a maximum rate of CO₂ production ($q_{max \text{ CO}_2}$) of 0.06 mM/h. The mixed effect of culture on crude oil characteristics, we found that the mixed culture was able to biodegrade the oil decreasing the total hydrocarbons contents (TPH) by 32%, alkanes of C₈ - C₁₁ and C₁₂ - C₁₇ decreased by 46 and 31% respectively. Thus obtained the mixed culture can be potentially used in a process MEOR.

1. INTRODUCCIÓN

La industria petrolera en México es una de las más importantes por su contribución a la economía nacional (PEMEX, 2011). La necesidad de satisfacer día con día la demanda de energéticos ha ocasionado un incremento en la producción de crudo y en consecuencia una acelerada reducción de las reservas probadas. Aunque el desarrollo de las tecnologías energéticas como solar, de hidrógeno, entre otras; son atractivas, los combustibles fósiles permanecen a la cabeza; por lo que el petróleo sigue siendo la principal fuente de energía mundial (Gudiña *et al.*, 2012).

Dentro de la industria del petróleo uno de los problemas es la eficiencia de recuperación del petróleo, para resolverlo es necesario estudiar otras tecnologías como las que utilizan microorganismos extremófilos capaces de producir metabolitos útiles en la recuperación y movilización del crudo. Además que estos mismos microorganismos puedan utilizar el petróleo como fuente de carbono y de energía y así ayudar a disminuir la contaminación debida a la explotación del petróleo (Youssef *et al.*, 2009; Lazar, 2007).

1.1. Definición y composición de petróleo

El petróleo es líquido y viscoso, formado por una mezcla compleja de hidrocarburos y otros compuestos orgánicos, incluyendo algunos compuestos metálicos, de los cuales los más notables contienen vanadio y níquel. Está compuesto principalmente por: 12% hidrógeno, 85% carbono y el 3% restante formado por compuestos como azufre (S), oxígeno (O) y nitrógeno (N). Según la estructura química de los hidrocarburos del petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes (Van Hamme *et al.*, 2003; Sugiura *et al.*, 1997; Tissot y Welte, 1982).

1.1.1. Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos (alcanos de cadena lineal) constituyen uno de los principales componentes del petróleo crudo.

Dentro de los hidrocarburos alifáticos se encuentran las cicloparafinas (cicloalcanos), las que están en menor proporción que los alcanos lineales y que los hidrocarburos aromáticos. También se presentan compuestos insaturados como los terpenos (fig. 1a) (Setti *et al.*, 1993).

1.1.2 Hidrocarburos aromáticos

En este grupo se encuentran hidrocarburos monoaromáticos como el benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (isómeros orto, meta, para) (fig. 1b). Estos hidrocarburos por lo general son referidos como los compuestos BTEX, presentan una solubilidad en agua relativamente alta (benceno: 1780 mg/L, tolueno: 490-627 mg/L) (Heath *et al.*, 1993).

1.1.3 Hidrocarburos polares o resinas

Esta fracción está constituida por compuestos con diversos grupos funcionales como: alcoholes, fenoles, cetonas, aminas, ácidos carboxílicos, compuestos heterocíclicos, entre otros; generalmente son compuestos de alto peso molecular, elevados puntos de ebullición y baja solubilidad (fig. 1c) (Wallnöfer *et al.*, 1984).

1.1.4 Asfaltenos

Los asfaltenos constituyen la fracción más pesada del petróleo. Algunas propiedades químicas de los asfaltenos son: a) la hidrogenación produce hidrocarburos poliheterocíclicos aromáticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos con átomos de oxígeno y azufre), b) se descomponen a temperaturas por encima de los 300-400 °C, sin embargo no se funden, c) su reacción con ácido sulfúrico forma ácido sulfónico, lo que se relaciona con su estructura poliaromática (fig. 1c) (Mansoori, 1998).

1.3. Recuperación del petróleo

El proceso de recuperación de petróleo incluye una serie de etapas las cuales producen aceite crudo o hidrocarburos, denominadas: Recuperación primaria, Recuperación secundaria y recuperación terciaria

1.3.1. Recuperación primaria

La recuperación primaria es el resultado de la presión natural del yacimiento produciendo aceite y gas. La recuperación primaria termina cuando la presión del yacimiento ha bajado demasiado, o cuando se están produciendo cantidades importantes de otros fluidos (gas y agua). El porcentaje de recuperación primaria del crudo es de 10-15%, pero puede ser tan bajo como 5% en yacimientos sin gas disuelto o alcanzar 20% y aún más en yacimientos que poseen baja permeabilidad y una bolsa de gas o un acuífero activo (Sen, 2008; Salager, 2005).

1.3.2. Recuperación secundaria

Consiste en la inyección de agua mediante pozos paralelos, la cual mantiene la presión del depósito y produce más aceite. El agua se inyecta en pozos inyectoros y desplaza o arrastra una parte del petróleo hacia los pozos productores, lo que provoca que la presión no baje y el petróleo siga siendo empujado a la superficie para recuperarlo (Cobeñas *et al.*, 2008). Con esta tecnología existe una recuperación del 10 al 40% de aceite en el depósito (Sen, 2008).

1.3.3. Recuperación terciaria

Después de la recuperación primaria y secundaria, el yacimiento contiene todavía 60-80% del crudo (Cobeñas *et al.*, 2008). Esto se debe a que la eficiencia de los métodos de recuperación primaria y secundaria está limitada debido a que el aceite restante está frecuentemente localizado en regiones del yacimiento que son difícil de acceder y se queda atrapado en los poros capilares de las rocas (Sen, 2008, Khire and Khan., 1994).

La recuperación terciaria o mejorada incluye técnicas dirigidas a aumentar la eficiencia de la recuperación para lo cual aplican métodos térmicos, químicos, inyección de gas y biotecnológicos. Esta última se conoce como la recuperación mejorada de hidrocarburos por actividad microbiana (MEOR) (Sen, 2008).

1.3.3.1. Recuperación Mejorada de Petróleo por Actividad Microbiana (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR)

La recuperación mejora por vía microbiana (MEOR) se encuentra dentro de la tercera etapa, de recuperación del aceite en los yacimientos que no pueden ser extraídos por técnicas de recuperación primaria o secundaria. Esta tecnología recupera o aumenta la producción del petróleo mediante aplicaciones biotecnológicas, ya que utiliza microorganismos o sus metabolitos que interaccionan con el aceite, por lo que mejoran su extracción y/o movilización (Sen, 2008; Lazar, 2007).

1.3.3.1.1. Mecanismos de la recuperación de petróleo por actividad microbiana (MEOR)

Existen tres estrategias para llevar a cabo el proceso de recuperación por actividad microbiana:

- 1) La inyección de nutrientes dentro del pozo o yacimiento para estimular el metabolismo microbiano, con el fin de movilizar el aceite residual. Se agregan nutrientes como fuentes de nitrógeno, fósforo, entre otros; junto con sustratos fermentables de bajo costo como las melazas. Este procedimiento se lleva a cabo con la finalidad de promover el crecimiento de los microorganismos para que produzcan metabolitos como CO₂, solventes y ácidos, donde estos metabolitos re-presurizan el yacimiento e incrementan la permeabilidad y la porosidad del mismo, ampliando las fisuras y los canales a través de la disolución de las rocas de carbonato del yacimiento, contribuyendo así con la liberación y recuperación (fig. 2b). Los microorganismos pueden fermentar carbohidratos para producir gases *in situ* como el CH₄, CO₂ y H₂, que pueden contribuir a la acumulación de presión en un depósito de baja presión. Estos gases pueden disolverse en el crudo y reducir

su viscosidad. Por otro lado las bacterias fermentativas producen ácidos como el propiónico y acético, así como solventes como la acetona, etanol, 1-butanol y butanona, los cuales disuelven o aumentan los precipitados orgánicos de los depósitos, mejorando así la movilidad de la fase aceite y provocar un aumento en la permeabilidad y porosidad de la roca carbonatada. En la tabla 2 se mencionan algunos microorganismos productores de estos metabolitos. Algunos microorganismos tienen la capacidad de degradar hidrocarburos pesados o de cadena larga (Banat, 2000; Sen, 2008; Youssef *et al.*, 2009; Khire y Khan., 1994).

- 2) Inyección de microorganismos indígenas provenientes del mismo pozo (aceite o agua) y enriquecidos externamente para potenciar su capacidad y favorecer la recuperación del petróleo. Estos microorganismos tienen la capacidad de producir metabolitos útiles como gas, ácidos o solventes, que ayudan a mejorar la movilización y recuperación del petróleo residual. Con el uso del cultivos de bacterias enriquecidas se puede recuperar el petróleo de la roca de yacimiento más fácilmente (Tomalá *et al.*, 2008; Sen, 2008).

Tabla 2. Microorganismos productores de solventes, ácidos y gases y su efecto en el yacimiento.

Microorganismos que lo producen	Tipo de metabolito	de Efecto	Referencia
<i>Clostridium</i> , <i>Zymomonas</i> , <i>Klebsiella</i>	Acetona, butanol y propan-2-diol	Mejoran la permeabilidad de la roca carbonada al disolver y reducir la viscosidad del aceite	Zobell CE., 1947, Khire and Khan., 1994b; Kalish <i>et al.</i> , 1964.
<i>Clostridium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>mixed</i> <i>Acidogens</i>	Propanoico butírico	Mejoran la permeabilidad y el grado de emulsificación	Bryant, 1987; Nazina <i>et al.</i> , 2003; Kalish <i>et al.</i> , 1964; Fratesi, 2002.
<i>Clostridium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Methanobacterium</i>	Metano hidrógeno	Represurizan el yacimiento, reducen la IFT y la viscosidad del aceite	Nazina <i>et al.</i> , 2003; Kalish <i>et al.</i> , 1964; Fratesi, 2002; Ono <i>et al.</i> , 2003.

- 3) Inyección de metabolitos, entre ellos los biosurfactantes. Los biosurfactantes son un grupo de compuestos producidos por bacterias, hongos y levaduras, que

en las interfaces de soluciones acuosas y las mezclas de hidrocarburos micro-emulsionan formando micelas, donde los hidrocarburos se pueden solubilizar en agua (Bordoloi and Konwar, 2009).

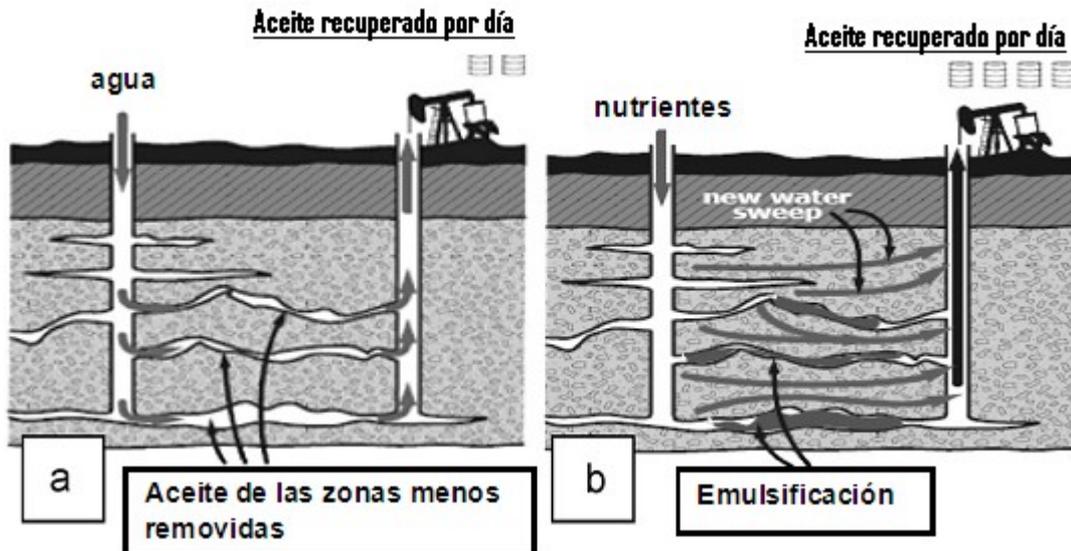


Figura 2. Proceso de recuperación de hidrocarburos. (a) Recuperación secundaria por inyección de agua, (b) Proceso de recuperación terciaria o MEOR, por inyección de nutrientes para estimular a los microorganismos autóctonos del yacimiento.

1.4. Características de los yacimientos

La posibilidad de vida de los microorganismos, para sobrevivir o reproducirse en los ambientes petroleros depende de las características físicas y de la composición química de los ecosistemas. El potencial redox, la disponibilidad de donadores y aceptores de electrones, la temperatura y la salinidad, son factores ambientales que permiten el desarrollo de las comunidades microbianas de los yacimientos de aceite (McInerney *et al.*, 1990; Youssef *et al.*, 2009).

- a) La temperatura es el principal factor limitante para el crecimiento microbiano en los yacimientos de petróleo. Los depósitos profundos de aceite que alcanzan una temperatura *in situ* de más de 130-150°C no pueden sostener el crecimiento microbiano. Este intervalo de temperatura se considera el límite máximo teórico para el crecimiento, debido a la inestabilidad térmica de las moléculas biológicas. Sin embargo existen yacimientos someros donde la temperatura va de 30 a 60 °C

a una profundidad de 400 m (Magot *et al.*, 2000; Yousseff *et al.*, 2009; Atlas, 1991).

Se han aplicado procesos MEOR a yacimientos con temperaturas por debajo de 55 °C (Chang *et al.*, 2009)

- b) La concentración de NaCl en la mayor parte los yacimientos es del 1 al 10% y constituye el 90% de los sólidos presentes en las salmueras (Khire and Khan, 1994b).
- c) Los valores de pH en los yacimientos pueden ir de 3 a 9.9 (Magot *et al.*, 2000; Yousseff *et al.*, 2009).

1.5. Microorganismos presentes en los yacimientos de petróleo

Varios grupos de microorganismos con diversidad fisiológica, habilidad metabólica y filogenética, han sido aislados de muestras de campo de petróleo, en la tabla 3 se observan esta gran variedad de microorganismos. Estos microorganismos pueden ser aerobios, anaerobios facultativos, y microaerófilos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Campylobacter*, *Oceanospirillum* y *Thiomicrospira*, entre otros. Se han aislado microorganismos fermentativos de reservorios de petróleo a bajas y altas temperaturas, los cuales poseen dos funciones metabólicas, como las fermentativas y respiratoria, y teóricamente pueden utilizar ambas estrategias para crecer y sobrevivir.

La mayor parte de estos microorganismos se consideran extremófilos por las condiciones a las que se desarrollan. Varios tipos de bacterias con diferentes funciones o aplicaciones en la tecnología MEOR han sido utilizados (tabla 4) (Youssef *et al.*, 2009; Zhengguo, 2000; Lazar *et al.*, 2007).

Tabla 3. Microorganismos aislados de muestras de petróleo.

Grupo bacteriano	Sustrato	Microorganismos	Referencia
Metanógenas	H ₂ , CO ₂ , acetato, metilaminas y dimetilaminas	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Methanomicrobiales</i> • <i>Methanobacteriales</i> • <i>Methanosarcinales</i> • <i>Methanococcales</i> • <i>Methanopyrales</i> 	Euzeby, 2008
Bacterias Sulfato-reductoras	<ul style="list-style-type: none"> • H₂, lactato y piruvato • H₂, ácidos orgánicos, etanol hidrocarburos de bajo peso molecular 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Desulfovibrionales</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Desulfovibrio</i> ○ <i>Desulmicrobium</i> • <i>Desulfobacterales</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Desulfobacter</i>, ○ <i>Desulfobulbus</i>, ○ <i>Desulfobacterium</i> • <i>Syntrophobacterales</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Thermosulforhabdus</i> (termófila) 	<p>Y Birkeland, 2005; Leu et al., 1999; Magot et al., 1992, 2004.</p> <p>Lien and Beeder, 1997; Lien et al., 1998b; Ommedal and Torsvik, 2007.</p>
Fermentadores	<ul style="list-style-type: none"> • Azúcares 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Thermotogae</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Thermotoga</i>, <i>Thermosipho</i>, <i>Geotoga</i>, <i>Petrotoga</i> • <i>Thermoanaerobacteriales</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Thermoanaerobacter</i>, ○ <i>Thermoanaerobacterium</i>, ○ <i>Caldanaerobacter</i> 	<p>Davey et al., 1993; L'Haridon et al., 2001, 2002; Lien et al., 1998a; Miranda-Tello et al., 2004, 2007</p> <p>Cayol et al., 1995; L'Haridon et al., 1995. Grassia et al., 1996; Fardeau et al., 2004;</p>
Fermentadores halofílicos	<ul style="list-style-type: none"> • Sacarosa 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Haloanaerobiales</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>H. acetethylicum</i>, <i>H. salsuginis</i>, <i>H. Congolese</i>, <i>H. kushneri</i> 	<p>Bhupathiraju et al., 1994, 1999; Ravot et al., 1997</p>
Fermentadores mesofílicos	<ul style="list-style-type: none"> • Carbohidratos • Peptona y aminoácidos pero no en azúcares 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusibacter paucivorans</i> • <i>Dethiosulfobivrio peptidovorans</i> • <i>Acetobacterium romashkovi</i> 	<p>Ravot et al., 1999</p> <p>Magot et al., 1997b</p> <p>Davydova-Charakhch'yan et al., 1992.</p>
Hipertermófilos		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Archaeoglobus</i>, • <i>Pyrococcus</i>, • <i>Thermococcus</i> 	<p>Grassia et al., 1996; L'Haridon et al., 1995; Stetter et al., 1993; Takahata et al., 2000.</p>
Microorganismos sintróficos	<ul style="list-style-type: none"> • H₂ y acetato 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Halanaerobium</i> con <i>Desulfohalobium retbaense</i> 	<p>Cayol et al., 2002</p>

Tabal 4. Funciones de las bacterias en la tecnología MEOR (Aladasani and Bai., 2010).

Bacterias	Funciones
<i>Acinetobacter</i>	
<i>Arthrobacter</i>	Reducen la tensión interfacial por formación de surfactantes
<i>Bacillus</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Bacillus</i>	Modifican la viscosidad por la producción de polímeros
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Xanthomonas</i>	
<i>Clostridium</i>	Reducen la viscosidad por la producción de gas
<i>Enterobacter</i>	
<i>Desulfovibrio</i>	
<i>Clostridium</i>	Reducen la viscosidad por la producción de solventes
<i>Zymomonas</i>	
<i>Klebsiella</i>	
<i>Clostridium</i>	Modifican la permeabilidad por la producción de ácidos
<i>Enterobacter</i>	
<i>Pseudomonas</i>	Reducen el contenido de parafina
<i>Arthrobacter</i>	

1.5.1. Microorganismos extremófilos

Un ambiente extremo es aquel en el que existen condiciones físico-químicas extremas e inusuales (Brock, 1969). A los microorganismos que viven en estos ambientes se le denomina extremófilos (Horikoshi, 1997). Estos microorganismos poseen características bioquímicas y metabólicas que les permiten vivir en hábitats poco comunes, resultando ser microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos debido a sus características, ya que sus biomoléculas son necesariamente resistentes a las condiciones agresivas de su entorno. Durante las últimas décadas se ha demostrado que las comunidades microbianas pueden encontrarse en muchas condiciones adversas como temperaturas muy elevadas (55 a 121°C) o bajas (-20 a 20°C) y pH extremos (alta alcalinidad pH > 8; alta acidez pH < 4), alta salinidad (NaCl 2 a 5 M) y presión alta, entre otras (Ramírez *et al*, 2004; Madigan *et al*, 2004).

1.5.1.1. Microorganismos halófilos

Se llaman halófilos a los microorganismos que requieren elevadas concentraciones de NaCl para su desarrollo y crecimiento.

Kushner and Kamekura, en 1988, propusieron diferentes categorías de microorganismos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl:

No halófilos: Su crecimiento óptimo se produce a una concentración de NaCl < 0.2 M (1% p/V). Existen microorganismos no halófilos capaces de crecer en medios hasta con 2.5 M de NaCl (15% p/v), llamados halotolerantes.

Halófilos débiles: También llamadas bacterias marinas. Su crecimiento óptimo se da a una concentración de 0.2 a 0.5 M de NaCl (1 a 3% p/v).

Halófilos moderados: Cuyo crecimiento óptimo se encuentra en concentraciones de 0.5 y 2.5 M de NaCl (3 al 15% p/v).

Halófilos extremos: Con un crecimiento óptimo de 2.5 a 5.2 M (15 a 32% p/v) de NaCl.

Los microorganismos halófilos son de gran interés en procesos de degradación de residuos tóxicos, tratamientos biológicos, tratamientos industriales que generan aguas residuales hipersalinas o en los procesos de extracción de petróleo, entre otros (Margesin and Schinner., 2001). Se ha encontrado microorganismos halófilos que producen polímeros con propiedades surfactantes y emulsionantes y que tienen aplicación en la recuperación de petróleo (Ventosa 1988). Zhaodong and Zhicheng. (2001) en un estudio de crecimiento de bacterias aisladas del petróleo, con diferentes concentraciones de NaCl en un intervalo de temperaturas de 40 a 50 °C, reportaron que la temperatura no tuvo efecto en el crecimiento de las bacterias y las concentraciones óptimas de NaCl para el crecimiento de estos microorganismos fueron de 0.26 a 0.56 M. Pantarato et al. (2009) aislaron una bacteria degradadora de hidrocarburos, utilizando una concentración de 0.51M de NaCl en un intervalo de temperatura de 30 a 40 °C, encontrando la máxima velocidad de crecimiento a 30 °C. Olgún et al. (2011) evaluaron la capacidad sulfuro-oxidante de cultivos mixtos a diferentes concentraciones de NaCl (0-1.7 M) y pH a 30 °C, para poder aplicarlos en el tratamiento de compuestos inorgánicos de sulfuro. Los cultivos fueron obtenidos de suelos alcalinos en varias regiones de México. Encontraron que la actividad sulfuro-oxidante depende de las concentraciones de NaCl, ya que dicha actividad disminuyó cuando la concentración de NaCl aumentó. La tabla 5 muestra concentraciones de NaCl empleadas en el aislamiento de microorganismos provenientes de diferentes sitios, además de las temperaturas en que los microorganismos fueron aislados.

Tabla 5. Microorganismos aislados de diferentes tipos de muestras con diferentes concentraciones de NaCl y temperatura.

NaCl [M]	Temperatura de incubación (°C)	Origen de la muestra	Tipo de microorganismo	Referencia
1.7	37	Sedimentos del Lago Salado, Utah	<i>Haloanaerobium alcaliphilum sp. nov</i>	Tsai et al., 1995
0-1.7	30	Suelos de México	<i>Thioalkalimicrobium cyclum.</i> , <i>Gamma proteobacterium.</i> , <i>Halomonas sp.</i> y <i>Bacteroidetes</i>	Olguín-Lora et al., 2011
0- 1.7	40-55	Pozos petroleros de Brasil	<i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i>	Gudiña et al., 2012
0.34	80	Reservorio petrolero Kubiki, en Niigata, Japón.	<i>Thermotoga petrophila sp. nov</i> y <i>Thermotoga naphthophila sp. nov</i>	Takahata et al., 2001
0.83 a 1	40 -50	Bacterias petroleras	-----	Zhaodon and Zhicheng., 2002
0.51	30 y 55	Aceite de la Cuenca de Campos, Brasil	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas genus.</i> , <i>Halomonas sp.</i> , <i>Microbacterium</i> y <i>Micrococcus.</i>	Pantorato de Vasconcelos et al., 2009
0.085	40-85	Reservorio de Dongxin	<i>Thermus SP3</i>	Hao and Wang, 2003
0.25	70	Plataforma de Córdoba, Veracruz	<i>Termoanabacter</i>	Castorena-Cortes et al., 2012

1.6. Biodegradación de hidrocarburos

La biodegradación de hidrocarburos se define como el cambio biológico, de la estructura química de un compuesto orgánico. La biodegradación frecuentemente permite la conversión de la mayor parte del C, N, P, S y otros elementos del compuesto original a productos inorgánicos por lo que esta conversión es conocida como mineralización. En el medio ambiente la mineralización de compuestos sintéticos o naturales se lleva a cabo por medio de la actividad microbiana. Es por esta capacidad para mineralizar compuestos antropogénicos, que los microorganismos juegan un papel muy importante en suelo, agua y sedimentos y en los ambientes petroleros (Alexander, 1994).

La velocidad de biodegradación de los hidrocarburos por microorganismos está determinada por varios factores ambientales como son: la temperatura, pH concentración de oxígeno, concentración de sal y las características fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos, entre otros (Atlas, 1984; Röling et al., 2003).

La capacidad microbiana para degradar hidrocarburos no está restringida a unos cuantos géneros, un diverso grupo de bacterias y hongos han mostrado esta habilidad (Atlas, 1981). Al parecer, aunque las bacterias inician la degradación de una mezcla sintética de derivados del petróleo, la degradación se aumenta cuando bacterias, hongos y levaduras están presentes. Este sinergismo entre microorganismos puede provocar un incremento en la velocidad y concentración de los hidrocarburos que son degradados (Foght et al., 1999; Komukai et al., 1996). Muchos de los compuestos del petróleo son degradables pero el proceso es muy lento (Malik and Ahmed, 2012).

Algunos estudios han demostrado que los microorganismos utilizados en el proceso de recuperación mejorada de petróleo por actividad microbiana (microbial enhanced oil recovery, MEOR) pueden degradar hidrocarburos, donde la fracción ligera es la más degradada, esto ocasiona cambios en las propiedades del aceite; como Peihui *et al.*, (2001) que aislaron microorganismos provenientes de agua de inyección, los cuales cambiaron la composición del aceite principalmente en la fracción de C₈-C₁₁ degradándola en un 30% con respecto al aceite original. Lazar *et al.* (1999) aislaron seis diferentes consorcios bacterianos de diferentes de lodos aceitosos, a los cuales se les estudio la capacidad de producción de biosurfactantes y biosolventes, así como la degradación aerobia de dos tipos diferentes de aceites. Estos consorcios bacterianos dieron una buena eficiencia de degradación en ambos aceites y también produjeron biosolventes y biosurfactantes. Sugiura *et al.* (1997); reportaron la biodegradación de cuatro diferentes tipos de petróleo (Árabe ligero, Dubai, Maya y Shengli) por una cepa pura de *Acinetobacter* sp T4 y por un consorcio microbiano (SM8) aislado de un suelo contaminado; el grado de biodegradación obtenido con el consorcio (SM8) fue 1.7 veces mayor al obtenido con *Acinetobacter* sp T4 para los cuatro tipos de petróleo. La biodegradación del petróleo crudo varió con respecto a su composición, los compuestos saturados de bajo peso molecular fueron degradados preferentemente en ambos cultivos. *Acinetobacter* no fue capaz de degradar compuestos aromáticos policíclicos tales como (alquil) naftalenos, (alquil) fenantrenos, (alquil) fluorenos y (alquil) dibenzotiofenos. Sin embargo, esta cepa

fue capaz de degradar más del 10% de las moléculas presentes en la fracción aromática del petróleo Árabe ligero. Malik and Ahmed, (2012); realizaron un estudio de biodegradación con un consorcio aclimatado a 37 °C y formado por 15 cepas diferentes durante tres semanas. Encontraron que este consorcio degradó compuestos alifáticos y aromáticos en un 94.84 y 93.75% respectivamente después de 24 días de incubación. Durante los primeros 12 días los alcanos de C₈-C₁₀ fueron completamente degradados. Gudiña et al. (2012); aislaron microorganismos presentes en muestras de aceite crudo identificados como *Bacillus* para poder aplicarlos en la recuperación del petróleo por vía microbiana, por el método de cultivo por enriquecimiento. Estos fueron capaces de degradar cadenas largas de n-alcanos bajo condiciones anaerobias bajo una temperatura de 40 °C después de un período de incubación de 15 días. Bajo condiciones aeróbicas encontraron que la cepa 191 degradó alcanos de C₁₈-C₂₄ y que las cepas 191, 551, 571, 572 y 573 degradaron n-alcanos entre C₁₈ y C₂₀ bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Hao et al., 2004; aislaron una cepa (TH-2) a partir de una muestra tomada en un pozo petrolero en Dongxin, la cual fue tratada bajo condiciones termofílicas. Con esta cepa llevaron a cabo un estudio de biodegradación a cuatro diferentes aceites crudos durante un tiempo de cultivo de 5 días; se analizaron los aceites tratados y los aceites originales, encontrando que la cepa degradó diferentes fracciones de los hidrocarburos en cada uno de los aceites tratados con la cepa (TH-2). Los hidrocarburos de C₁₀-C₁₅ aumentaron del 12-35% en el contenido de estos hidrocarburos después del tratamiento con la cepa en casi todos los aceites, solo en uno de ellos ocurrió lo contrario ya que disminuyó alrededor del 42%. Lo mismo ocurrió con los hidrocarburos de C₁₅-C₂₀, sólo que en este caso los cuatro aceites tratados tuvieron un aumento de 7-50% en el contenido de estos hidrocarburos. Los hidrocarburos de C₂₀-C₂₅ presentaron una disminución de 39-76%. Zheng et al., 2011; aislaron dos cepas (*Geobasillus pallidus* XS2 y XS3) capaces de degradar hidrocarburos a partir de muestras de suelo contaminado con aceite crudo pesado de Yumen, China. Después de un período de incubación de 20 días obtuvieron una degradación de 10-15% del aceite crudo, donde XS2 redujo alcanos de n-C₈-C₁₀, mientras que XS3 tuvo un incremento en n-C₂₀-C₂₆. La cepa XS3 fue capaz de degradar más alcanos de cadena corta que de cadena larga. Hao and Wang., 2003; llevaron a cabo un experimento a 70°C con una bacteria termofílica (*Thermus sp3*) aislada de un pozo petrolero en Shengli, durante 7 días a presión atmosférica; realizaron un análisis del aceite crudo antes y después del experimento. Encontraron que la distribución de los alcanos de C₇-C₁₀ y de C₁₀-C₁₅ aumentó alrededor del 10 y 15% respectivamente en la fracción de hidrocarburos, mientras que la fracción

de hidrocarburos de C_{20} - C_{25} disminuyó más del 50%; *Thermus sp3* afectó las propiedades físicas y químicas del aceite.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la disminución de la producción de hidrocarburos por métodos convencionales, es necesario explorar otras alternativas para la recuperación de aceite crudo. Procesos biotecnológicos como la recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR), pueden aumentar la recuperación de petróleo con la estimulación y/o inyección de microorganismos. Este proceso biotecnológico además de ser eficiente, es menos costoso y tiene menor impacto en el medio ambiente. Para ofrecer dichas alternativas, es necesario obtener y caracterizar microorganismos provenientes de muestras de aceite, así como caracterizar los metabolitos que producen e interaccionen con el petróleo y que pueden favorecer su recuperación; lo que permitirá manipularlos en el interior del pozo dando mejor eficiencia a la tecnología MEOR.

3. HIPÓTESIS

Los microorganismos del cultivo mixto provenientes de una muestra de petróleo tienen la capacidad de producir metabolitos y biodegradar aceite crudo.

4. OBJETIVOS

- **Objetivo General**

- Obtener y caracterizar un cultivo mixto proveniente de un crudo mexicano y determinar el efecto sobre un aceite.

- **Objetivos Específicos**
 - Obtener un cultivo mixto que produzcan solventes y ácidos a partir de crudos mexicanos.
 - Caracterizar microbiológica y cinéticamente el cultivo mixto.
 - Evaluar el efecto del cultivo mixto sobre un aceite.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La figura 3 muestra la estrategia experimental utilizada para el desarrollo de los experimentos. Para aislar los microorganismos de la muestra de aceite crudo se llevaron a cabo tres cultivos de enriquecimiento con el medio de cultivo de la tabla 4, a 32 °C. Se caracterizó microbiológicamente (observaciones microscópicas en fresco y por tinción de Gram) y cinéticamente al cultivo mixto aislado (con diferentes concentraciones de sustrato). Finalmente se evaluó el cambio de las propiedades del crudo con el cultivo mixto seleccionado.

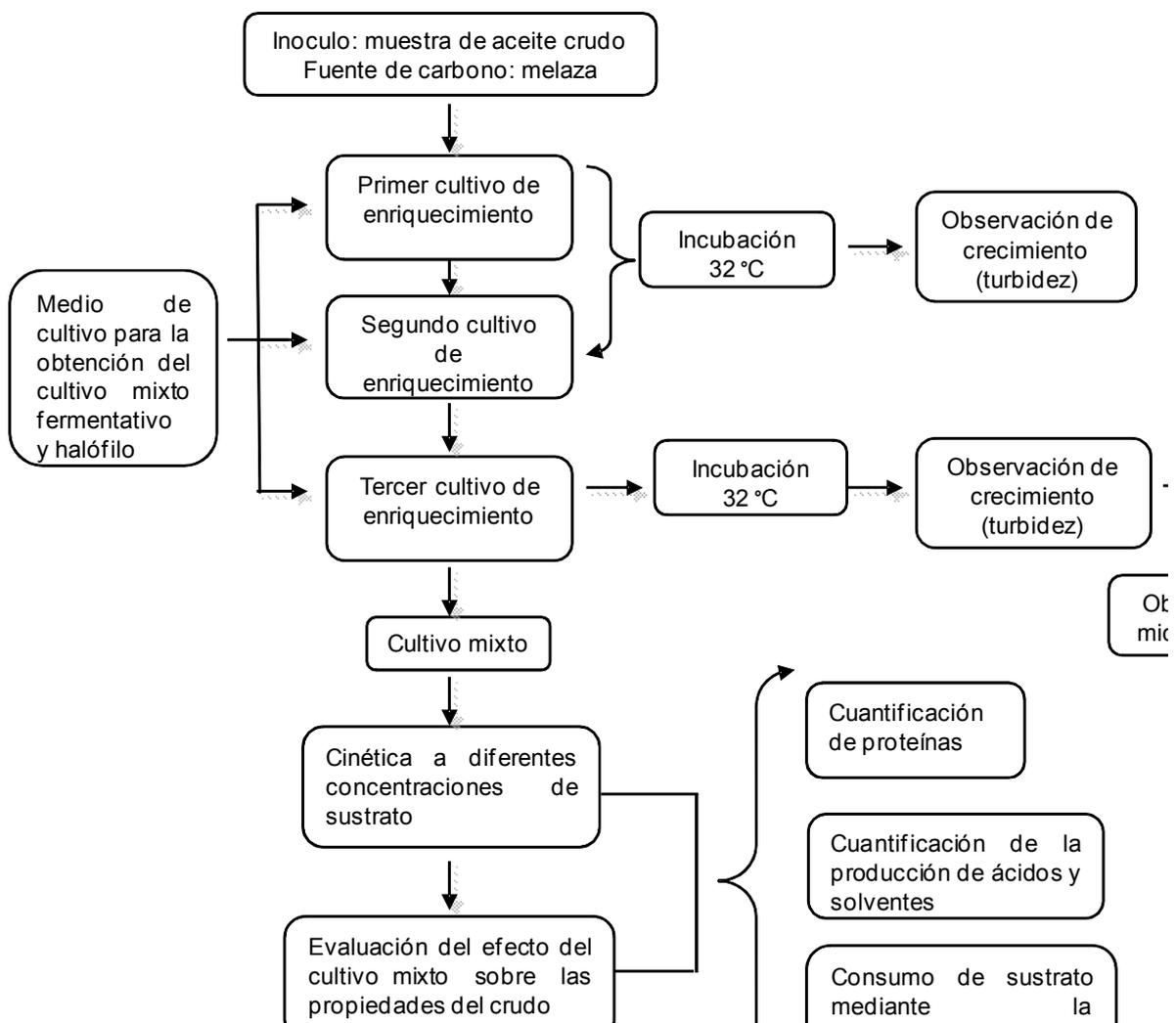


Figura 3. Estrategia experimental seguida durante los experimentos.

5.1. Inóculo

Se obtuvo de una muestra de aceite crudo de un campo petrolero de Veracruz con una densidad API de 25.4 y una concentración 5 g/L de NaCl.

5.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la obtención y caracterización del cultivo mixto halófilo está descrito en las tablas 6 y 7, suplementado con melaza como fuente de carbono.

Tabla 6. Medio de cultivo utilizado para microorganismos fermentadores.

Compuesto	Cantidad (g/L)
KH ₂ PO ₄	2.7
K ₂ HPO ₄	13.9
NaCl	50
Extracto de levadura	0.5
NaNO ₃	1
MgSO ₄ 2.5%	10 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄ 10%	10 mL
Solución de minerales *	10 mL

*La solución se prepara y esteriliza por separado

El pH del medio de cultivo se ajustó a 6.8 ± 2 con una solución de NaOH o HCl 1N. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb/plg² durante 15 minutos.

5.2.1. Preparación del medio de cultivo

En un matraz Erlenmeyer que contenía 800 mL de agua destilada se adicionaron cada uno de los componentes mencionados en la tabla 6, se disolvieron con agitación magnética y se ajustó el pH del medio de cultivo a 6.8. Se aforó a 1 L con agua destilada. Se transfirieron 45 mL de medio a botellas serológicas de 125 mL para cada uno de los cultivos de enriquecimiento. Las botellas serológicas se taparon con septos de neopreno y se sellaron con aros metálicos. Se esterizaron a 15 libras de presión y 121 °C de temperatura durante 15 minutos. Se dejaron enfriar y posteriormente bajo condiciones estériles se adicionó la solución de minerales. La solución de la fuente de carbono

(melaza) se adicionó hasta el momento de la inoculación, como se describe posteriormente.

Tabla 7. Solución de minerales

Compuesto	Cantidad (g/L)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.1
MnCl ₂ · H ₂ O	0.66
NaCl	1.0
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1
CuCl ₂	0.01
ZnCl ₂	0.08
AlCl ₃	0.05
H ₃ BO ₃	0.01
NaMoO ₄	0.04

5.2.2. Solución de minerales

La solución mineral se preparó adicionando cada componente en el orden indicado en la tabla 7, asegurándose que cada uno de sus componentes se disolviera completamente. La solución se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm y se conservó en un recipiente estéril de vidrio color ámbar en refrigeración a 4 °C. Esta solución es estable por un periodo de tres meses, mientras no presente precipitación de las sales ni contaminación.

5.2.3. Solución de melaza

Se preparó pesando 30 g de melaza y disolviéndola en un volumen de 100 mL de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/plg² durante 15 minutos. Además se filtró con una membrana de 0.22 µm y se conservó en un recipiente estéril de vidrio ámbar en refrigeración a 4 °C. Esta solución tuvo una concentración inicial de 90 g/L de sacarosa.

5.3. Enriquecimiento del cultivo mixto

El propósito de los cultivos de enriquecimiento es la obtención de un cultivo mixto estable. Con la sucesión de los enriquecimientos se tienen microorganismos adaptados a las

condiciones de cultivo. La mayoría de los medios de enriquecimiento son diseñados para que crezca más de un tipo de microorganismos.

5.3.1. Primer cultivo de enriquecimiento

Para la obtención del cultivo mixto halófilo y fermentador que produjera CO₂ solventes o ácidos, se llevaron a cabo cultivos en lote con el medio descrito en la tabla 4 y una muestra de crudo mexicano como inóculo y melaza como fuente de carbono.

A las botellas serológicas que contenían 45 mL de medio estéril, se les adicionó 3 mL de inóculo (petróleo) y 0.3 mL de melaza para tener una concentración de 3.44 mM. En esta etapa las botellas se incubaron a 32 °C durante 168 hrs, con una agitación de 115 rpm. Se revisaron diariamente para observar turbiedad como prueba de crecimiento del cultivo.

5.3.2. Segundo cultivo de enriquecimiento

Los cultivos del primer enriquecimiento que presentaron crecimiento medido como turbidez, fueron reinoculados en botellas serológicas que contenían 45 mL de medio fresco transfiriendo 5 mL del cultivo del primer enriquecimiento y se adicionó la misma cantidad de fuente de carbono que en el primer enriquecimiento. Los cultivos se incubaron a 32 °C con agitación de 115 rpm, durante 96 h.

5.3.3. Tercer cultivo de enriquecimiento

Los cultivos del segundo enriquecimiento que presentaron crecimiento, fueron reinoculados en medio fresco bajo las mismas condiciones que el primer y segundo enriquecimiento, incubados durante 72 h para obtener finalmente el cultivo mixto.

5.4. Prospección de producción de metabolitos por el cultivo mixto

Para saber que metabolitos producía el cultivo mixto obtenido del aceite crudo, se transfirieron 5 mL de este cultivo a botellas serológicas que contenían 45 mL de medio fresco. Se probaron diferentes concentraciones de melaza medido como sacarosa (2.92, 5.74, 7.31, 14.61 y 29.23 mM de sacarosa). Se incubó a 32 °C con agitación de 115 rpm durante dos semanas. Se tomaron muestras líquidas de estos cultivos al final del período de incubación, para observar la producción de ácidos y solventes.

5.5. Caracterización cinética del cultivo mixto

Con el propósito de obtener algunos parámetros cinéticos del cultivo mixto obtenido. Se llevaron a cabo cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato (melaza medida como sacarosa).

En botellas serológicas que contenían 45 mL de medio de cultivo estéril se adicionaron 5 mL de inóculo y solución de melaza estéril para tener concentraciones finales de 6.3; 13.17; 33.16; 43.16 y 74.64 mM de sacarosa.

Las botellas se incubaron a 32 °C en agitación (115 rpm) durante 216 horas.

Se prepararon 20 botellas para cada concentración y se retiraron dos botellas cada 24 horas para cuantificar el consumo de sustrato, producción de solventes y ácidos, crecimiento microbiano y pH, de la fase acuosa. Se determinó producción de CO₂ de la fase gas en diferentes tiempos a lo largo del tiempo de experimentación.

5.6. Evaluación del cambio en las propiedades del crudo con el cultivo mixto

El diseño experimental realizado en este apartado se muestra en la tabla 8, donde cada tratamiento se llevó a cabo por duplicado. Se evaluó el efecto del cultivo mixto y la producción de sus metabolitos sobre las características del aceite. Para ello se utilizaron botellas serológicas de color ámbar de 250 mL conteniendo un volumen de trabajo de 90 mL. El inóculo, la fuente de carbono (melaza) y aceite se adicionaron bajo condiciones estériles. Las botellas se taparon con septos de neopreno y se sellaron con aros metálicos.

Se preparó una botella control, donde solo se adicionó el aceite para evaluar actividad de microorganismos autóctonos que pudieran interferir con los resultados obtenidos con los cultivos mixtos.

5.6.1. Condiciones de la prueba

Los sistemas fueron incubados a 32 °C con una agitación de 115 rpm, durante 20 días.

Tabla 8. Tratamientos realizados para evaluar el cambio en las propiedades del crudo por el cultivo mixto aislado.

Tratamiento	Medio de cultivo (mL)	Inoculo (mL)	Fuente de carbono (mL)	Aceite (mL)	Volumen Total (mL)
1	30.6	9	5.4	45	90
2	36	9	-----	45	90
3 (control)	45	-----	-----	45	90

5.6.2. Muestreo

Para el análisis de las muestras se tomaron 2 mL de la fase líquida de cada uno de los sistemas en condiciones estériles, se colocaron en viales tipo eppendorf, se centrifugaron a 12,185xg durante 10 min. Del sobrenadante se determinaron azúcares, solventes y ácidos, pH y de la pastilla se determinó proteína. A la parte aceitosa se le analizó la composición de hidrocarburos C₁ a C₄₀ para determinar el efecto del cultivo mixto y sus metabolitos sobre el aceite, al final del tiempo de cultivo.

5.7. Técnicas analíticas

3.7.1 Cuantificación de microorganismos viables

Para evaluar los microorganismos viables del cultivo mixto halófilo fermentador, se realizó un conteo en placa. Esta técnica se basó en contar las “unidades formadoras de colonias” (UFC) presentes en un mililitro de muestra. Cada colonia que se desarrolló en el medio de cultivo después de 48 horas de incubación a 32 °C, provino de un microorganismo o

de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos fueron capaces de formar colonias, es decir UFC.

Para llevar a cabo la cuantificación de microorganismos viables se utilizó el método de dilución en placa (Gerhardt *et al*, 1981) el cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Preparación de las diluciones

Se prepararon tubos de ensaye con 9 mL de solución salina al 0.9%, los tubos se taparon con tapón de rosca y se esterizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb/plg² de presión durante 15 min.

Se tomó 1 mL de cultivo de enriquecimiento en condiciones estériles y se diluyó en un tubo con tapón de rosca que contenía 9 mL de la solución salina siendo esta la dilución 10⁻¹, de esta dilución se transfirió una alícuota de 1 mL en un segundo tubo que contenía solución salina hasta llegar a una dilución de 10⁻⁶.

b) Preparación de placas

Se prepararon cajas Petri que contenían 25 mL de medio de cultivo que se menciona en la tabla 4 y para solidificarlo se le agregó agar (15 g/L). De cada una de las diluciones se tomaron 0.05 mL con una pipeta serológica estéril de 1 mL y se colocó en una placa, se distribuyó el cultivo sobre la superficie del medio sólido de forma homogénea, ayudado de una asa bacteriológica (estéril). Las placas se incubaron a 32 °C durante 48 h. Después de este tiempo, se describieron las características macroscópicas y microscópicas de las colonias que crecieron.

5.8. Medición del crecimiento microbiano de los cultivos de enriquecimiento

El crecimiento de los cultivos de enriquecimiento, se evaluó por medio de dos metodologías: observación de turbidez en las botellas, y midiendo cada 24 h su densidad óptica a 560 nm con un espectrofotómetro Spectronic 20. También se evaluó el crecimiento indirectamente por cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976).

5.9. Tinción de Gram

Para determinar la morfología del cultivo mixto, se llevaron a cabo preparaciones en portaobjetos y se tiñeron por la técnica de tinción de Gram (Madigan et al., 2004).

5.10. Microscopía electrónica

Para obtener un estudio más detallado de las estructuras celulares se hizo uso de la microscopía electrónica de barrido.

a) Reactivos

Los reactivos utilizados para la microscopía electrónica fueron:

- Glutaraldehído al 3.5% en solución amortiguadora de fosfatos
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.3
- Tetraóxido de osmio al 2% en solución amortiguadora de fosfatos
- Solución de etanol al 30%
- Solución de etanol al 40%
- Solución de etanol al 50%
- Solución de etanol al 70%
- Solución de etanol al 80%
- Solución de etanol al 90%
- Etanol absoluto

b) Procedimiento para preparación de la muestra a observar

Se tomaron 2 mL del cultivo mixto y se colocaron en tubos eppendorf, centrifugaron a 9,900xg durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se agregó el fijador primario (glutaraldehído) al 3.5%, se dejó en contacto durante 24 h. Pasado este tiempo se retiró el exceso de glutaraldehído y se lavó la preparación con una solución amortiguadora de fosfatos. Se agregó un post-fijador (tetraóxido de osmio al 2%) y se dejó durante 1 h. Se retiró el exceso de tetraóxido de osmio y se empezó con la deshidratación de la preparación con la solución de etanol al 30%, realizando dos

cambios de esta solución cada 10 min. Se quitó el exceso de etanol al 30% y se agregó la solución de etanol al 40%. Se siguió el mismo procedimiento anterior, con las demás concentraciones de etanol hasta llegar al etanol absoluto.

Para secar las preparaciones, se encapsularon las muestras en cápsulas microporosas y se secaron al punto crítico. Después las muestras se pegaron y se fijaron. Se cubrieron con oro para tener una muestra conductiva. Se realizó la observación en el microscopio electrónico.

5.11. Cuantificación de CO₂

La evaluación de la cantidad de CO₂ producido se llevó a cabo por una técnica volumétrica. En donde el carbón en la fase gas (metano y CO₂) fue medido por desplazamiento de salmuera (300 g/L) contenida en una columna, a pH 2 con el fin de evitar la disolución del CO₂ (Durán et al., 2011). Para conocer los moles de CO₂ producidos se utilizó la ecuación general de los gases.

La composición del biogás se determinó por cromatografía de gases con un detector de conductividad térmica (TCD). Se utilizó una columna Carbosphere 80/100. La temperatura del horno fue de 140 °C, la del inyector de 170 °C y la del detector de 190 °C. Se utilizó helio (25 mL/min) como gas acarreador.

5.12. Cuantificación de proteínas

La evaluación de la cantidad de biomasa producida por el cultivo a través del tiempo de experimentación se llevó a cabo por medio de un método colorimétrico para proteína (Bradford, 1976).

a) Reactivos

Los reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas fueron:

- Solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (1 g/L)
- Etanol al 96%
- Acido fosfórico al 85%

- Solución de azul de Coomassie
- Solución salina 0.85%
- Solución de NaOH 0.1 N

b) Preparación de la curva estándar

A partir de la solución patrón de BSA 1 g/L, se prepararon diluciones en concentraciones de 5 a 50 mg/L. En tubos de ensaye se colocaron 0.5 mL de cada una de las diluciones, se adicionaron 0.5 mL del reactivo de azul de Coomassie. Se agitó en vórtex y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofómeto de UV-visible. Cada concentración se preparo por triplicado. La lectura se efectuó entre 5 y 30 min después del inicio de la reacción. Se graficó la absorbancia obtenida vs la concentración y se obtuvo la ecuación de la recta (ANEXO 4. y 4.1).

c) Preparación de las muestras

Para la cuantificación de proteína en las muestras se centrifugó 1 mL de muestra del cultivo a 9,000xg durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante. Al precipitado de células resultante, se le agregó solución salina al 0.85% hasta completar el volumen de la muestra original (1 mL), se resuspendió en el vortex (primer lavado), se centrifugó nuevamente a 9,000xg durante 10 min y se siguió el mismo procedimiento hasta realizar un tercer lavado.

De la última resuspensión se tomaron 300 µL para realizar la hidrólisis de la proteína y se colocaron en un tubo de ensaye, se adicionaron 1.2 mL de solución salina al 0.85% y 1.5 mL de la solución de NaOH 0.1 N. Se agitaron las muestras en vortex y se colocaron en un baño de temperatura controlada durante 1 h a 85 °C.

Una vez terminado el tiempo de hidrólisis se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se siguió el mismo procedimiento que para la curva patrón

5.13. Consumo de sustrato

La cuantificación del consumo de sustrato, se llevó a cabo por el método colorimétrico de azúcares totales (método Fenol-sulfúrico) (Dubois, 1956). En este método todos los azúcares se deshidratan con ácido sulfúrico concentrado formando furfurales o alguno de sus derivados, a los que a su vez se condensan con fenoles presentes en la mezcla de reacción, para dar compuestos de coloración naranja-amarillento cuya densidad se mide espectrofotométricamente a 490 nm.

a) Reactivos

Los reactivos utilizados para la cuantificación del consumo de sustrato fueron los siguientes:

Solución de fenol al 5%

H₂S concentrado con hidrazina al 0.5%

Solución de sacarosa al 0.01 %

b) Preparación de la curva estándar

A partir de la solución patrón de sacarosa de 100 mg/L se prepararon diluciones en concentraciones de 10 a 50 mg/L.

De cada concentración se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de ensaye, se agregó 1 mL de solución de fenol al 5% y 5 mL de la solución de ácido sulfúrico. Se homogenizó en un vórtex, se dejó enfriar y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Cada dilución se realizó por duplicado.

Se graficó la absorbancia vs la concentración y se obtuvo la ecuación de la recta (Azúcares totales = (Absorbancia 490 nm – 0.0106)/ 0.0093), con la que se calculó la concentración de sustrato de cada una de las muestras (anexo 3.).

c) Preparación de las muestras

Para la cuantificación de las muestras se realizaron diluciones para tener una concentración dentro de la curva estándar. De cada dilución se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de ensaye, se siguió el mismo procedimiento que para los

estándares. La cuantificación del consumo de melaza se realizó con la ecuación de la recta de la curva patrón

5.14. Cuantificación de solventes y ácidos

La cuantificación de solventes y ácidos se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases modelo HP 5890, con detector de ionización de flama (FID). Con una columna AT-1000 (15 m x 0.53 mm x 1.2 μ m). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 6.5 mL/min, con las siguientes condiciones de operación:

$T_{\text{columna}} = 80^{\circ}\text{C}$ con un incremento de $26^{\circ}\text{C} / \text{min}$ hasta 200°C por 1 minuto

$T_{\text{inyector}} = 200^{\circ}\text{C}$ en modo split-less.

$T_{\text{detector}} = 200^{\circ}\text{C}$

a) Preparación de la curva estándar

Se preparó una solución patrón de acetona, etanol, butanol, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico a una concentración de 1 g/L. Se realizaron diluciones en concentraciones de 20 a 800 mg/L. De cada dilución se transfirieron 950 μ L y se colocaron en viales para cromatografía, se adicionaron 50 μ L de HCl al 50%, se taparon y se colocaron en el automuestreador. Cada dilución se inyectó por duplicado. Se construyó una curva patrón graficando área vs concentración (ANEXO 1. y 2.).

b) Preparación de las muestras

De cada muestra se tomo 1 mL, se centrifugó a 15 rpm por 10 min. Después se filtraron con una membrana de nitrocelulosa de 0,42 μ de tamaño de poro. Posteriormente las muestras se colocaron en viales cromatográficos, y se siguió el mismo procedimiento que los estándares para cuantificar los metabolitos.

5.15. Tratamiento de resultados para la obtención de parámetros cinéticos

De cada cinética se calculó la velocidad de consumo de sustrato. Se graficó la concentración de sacarosa en función del tiempo (fig. 4). La pendiente de la recta corresponde a la velocidad de consumo de sustrato.

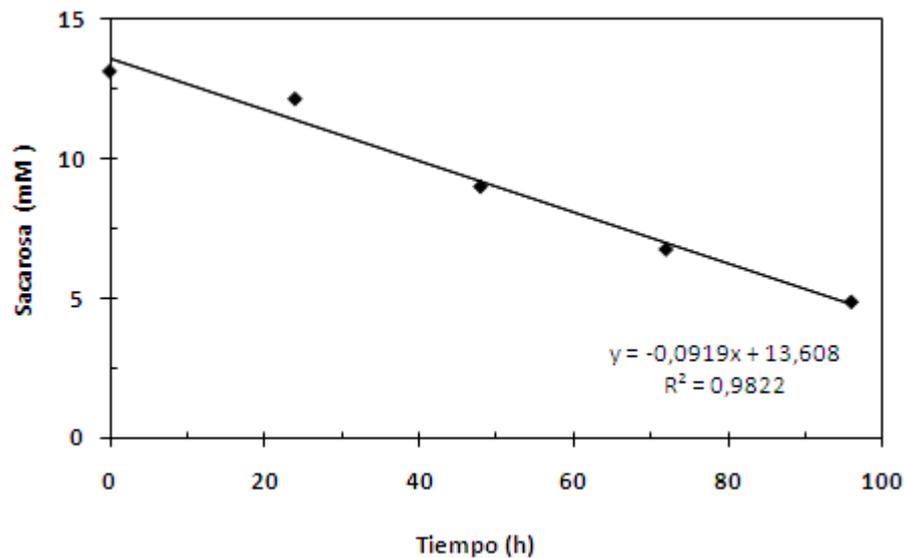


Figura 4. Consumo de sacarosa por el cultivo mixto.

Para obtener la velocidad máxima de consumo de sacarosa se graficaron todas las velocidades de consumo de sacarosa vs las concentración de sacarosa inicial. Los resultados de velocidades obtenidas graficadas vs concentración de sacarosa, fueron ajustadas por el modelo de Monod (ecuación 1) e implementando el procedimiento de mínimos cuadrados (solver.xl, Microsoft.excel) (figura 5).

$$q = \left(\frac{q_{m\acute{a}x} \cdot S_{sacarosa}}{K_s + S_{sacarosa}} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

$q_{m\acute{a}x}$ = Velocidad máxima de consumo de sustrato (mM/L*h)

q = Velocidad de consumo de sustrato (mM/*h)

$S_{sacarosa}$ = Concentración de sustrato (mM/)

K_s = Constante de afinidad para el sustrato (mM)

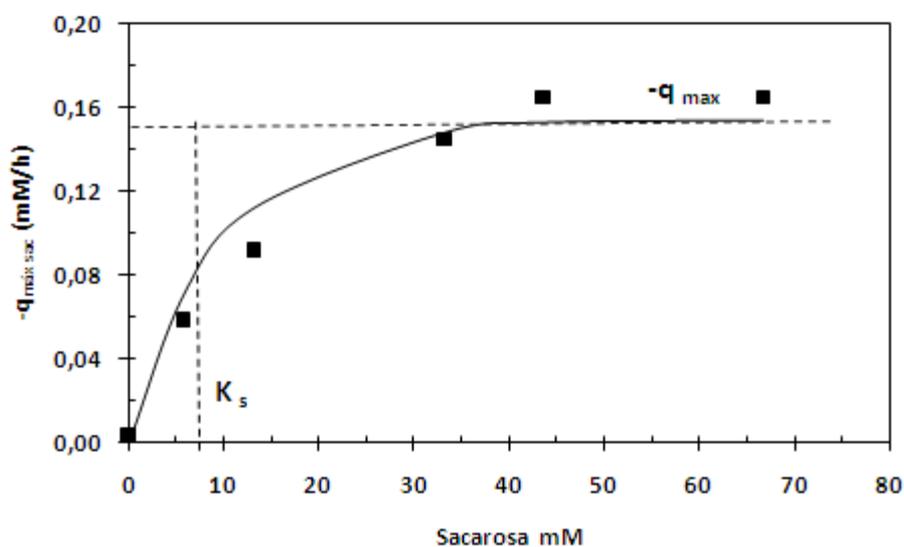


Figura 5. Velocidad de consumo de sacarosa en función de su concentración, por el cultivo mixto.

También se linearizaron los valores obtenidos con el modelo de Lineweaver-Burk (para calcular k_s) y Eadie-Hofstee (calcular $\mu_{\text{máx}}$), encontrándose similitud en los valores de los parámetros que se obtuvieron con el modelo de Monod.

5.16. Contenido de hidrocarburos totales

El contenido de hidrocarburos totales fue analizado por cromatografía de gases (HP 6890N) con detector de ionización de flama (FID), de acuerdo con el método de la EPA 8515. Con una columna capilar DB-1, utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 1.4 mL/min, bajo las siguientes condiciones de operación:

T_{columna} : 45 °C por 3 min, de 45 – 100 °C incrementar la temperatura 20 °C/min, de 100 – 200 °C incrementar la temperatura 10 °C/min, 200 – 255 incrementar la temperatura 10 °C/min, 255 - 290 °C incrementar la temperatura 10 °C/min y por ultimo mantener la temperatura a 290 °C por 5 min. T_{inyector} : 250 °C y T_{detector} : 250 °C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Obtención del cultivo mixto proveniente de una muestra de petróleo

Con el propósito de obtener un cultivo estable para poder caracterizarlo cinéticamente, se realizaron tres cultivos de enriquecimiento. En el primer cultivo se obtuvo poco crecimiento microbiano, que fue aumentando gradualmente hasta obtener mayor turbidez en pocas horas en el tercer cultivo. Se observó que a una concentración 0.85 M NaCl, el crecimiento del cultivo no se inhibió.

La tabla 9 muestra los resultados de la turbidez en los tres cultivos de enriquecimiento, se observa que en el tercer cultivo de enriquecimiento la turbidez fue mayor y se obtuvo en un intervalo de 60-72 horas.

Tabla 9. Crecimiento microbiano en cada uno de los enriquecimientos para la obtención del cultivo mixto.

Sistema	1er enriquecimiento	Horas de incubación	2º enriquecimiento	Horas de incubación	3er enriquecimiento	Horas de incubación
1	X	168	XX	120	XXXX	72
2	XX	168	XX	96	XXXX	72
3	X	168	XX	120	XXXX	60

Turbidez: x, poca; xx: media; xxxx: abundante.

En algunos estudios se ha visto que para obtener cultivos mixtos o cepas puras es más conveniente llevarlo a cabo por cultivos de enriquecimiento (Gudiña *et al.*, 2012). Otro de los factores que influyen en el aislamiento de cultivo mixtos o cepas puras provenientes de diferentes sitios es la concentración de NaCl tal es el caso de Zhaodong and Zhicheng, (2001); Olgún *et al.*, (2011).

Se ha reportado que la temperatura no influye en el crecimiento de las bacterias cuando se emplean diferentes concentraciones de NaCl (Pantarato *et al.* 2009), pero la actividad de los microorganismos si se afecta cuando se usan diferentes concentraciones de NaCl (Olgún *et al.*, 2011).

6.1.1. Caracterización morfológica del cultivo mixto aislado de una muestra de petróleo

El crecimiento microbiano del cultivo mixto fue evaluado con base a la turbiedad observada y se realizaron observaciones al microscopio del tercer enriquecimiento.

6.1.1.1. Observación macroscópica

La tabla 10 muestra las características morfológicas de las colonias del tercer enriquecimiento. Las colonias fueron redondas, de color blanco y beige, con consistencia cremosa y dura, opaca y filamentosa (figura 6). La cepa 1 tuvo mayor formación de colonias (51×10^4) que la cepa 2 (44×10^2). Tsai et al. (1995) aislaron una cepa halofílica moderada y fermentadora de sedimentos del lago salado de Utah, encontrando que la temperatura óptima de crecimiento fue de 37 °C, la cepa presentó la siguiente morfología colonial: borde entero, liso, opaco de color amarillento, resultados que concuerdan con los encontrados para las colonias aisladas en este trabajo. Hao *et al.*, (2004); describe la morfología de colonias aisladas de cultivos provenientes de aceites petroleros, mencionan que la morfología de las colonias eran lisas, transparentes, con y sin color; además de estar formadas por bacilos, lo que concuerda con nuestro trabajo.

6.1.1.2. Observación microscópica en fresco y con tinción de Gram

La caracterización de las colonias formadas se llevo a cabo por medio de microscopía óptica utilizando la tinción de Gram. Las observaciones mostraron que estas colonias estaban formadas mayormente por bacilos y cocos (libres y formando cadena (tabla 10)). De las muestras teñidas se pudo observar que había tanto células Gram positivas como Gram negativas (Fig. 7).

Tabla 10. Morfología colonial y microscópica de las colonias obtenidas del cultivo mixto, proveniente del aceite crudo.

Características	Colonias del cultivo mixto	
	C1	C2
Color	Beige	Blancas
Forma	Circular	Filamentosa
Consistencia	Cremosa	Dura
Descripción	Bacilos	Cocos

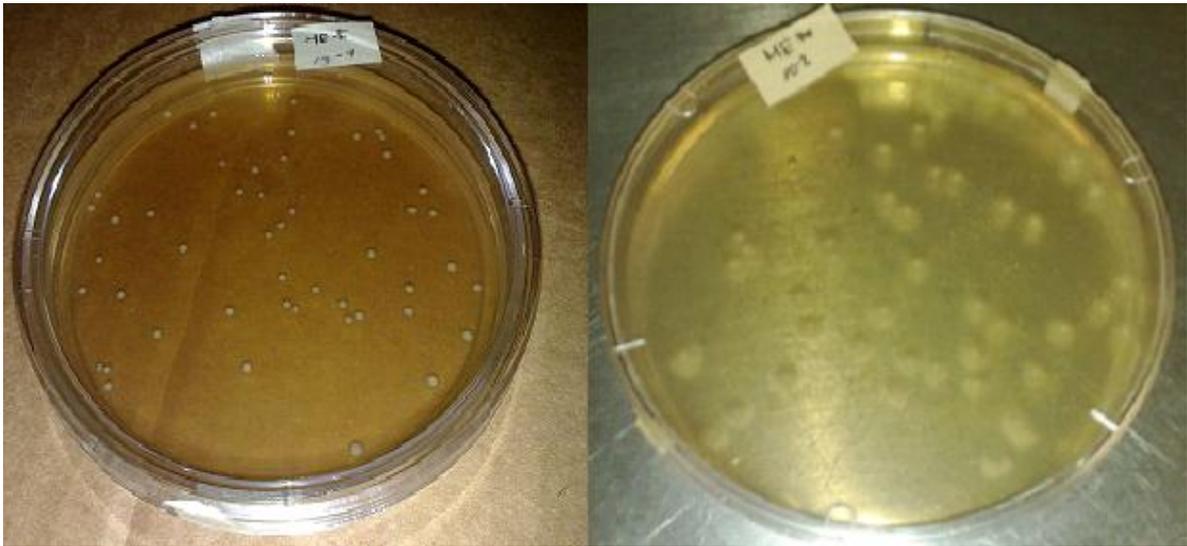


Figura 6. Colonias formadas por el cultivo mixto en medio sólido.

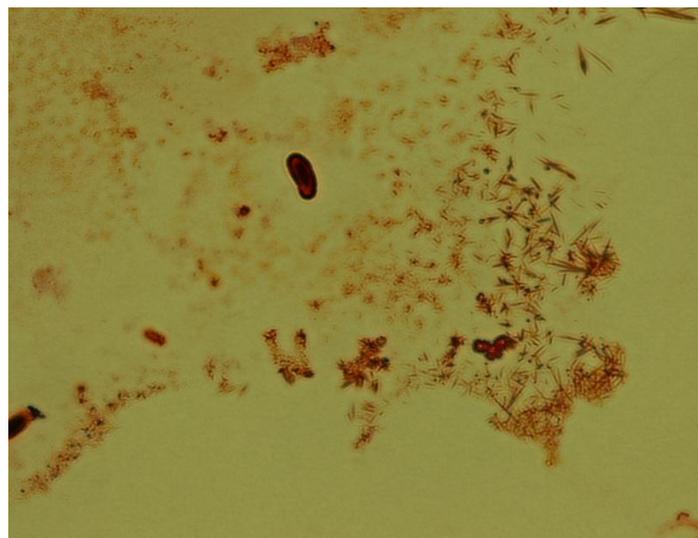


Figura 7. Micrografía de células Gram positivas (rosas) y Gram negativas (violetas) presentes en el cultivo mixto.

6.1.1.3. Observación al microscopio electrónico de barrido

La figura 8 muestra las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico de barrido. En la micrografía 8,a) se observa la estructura de bacilos (solos y formando cadena) y cocos con tamaños de 5 μm y en la micrografía 8,b) bacilos.

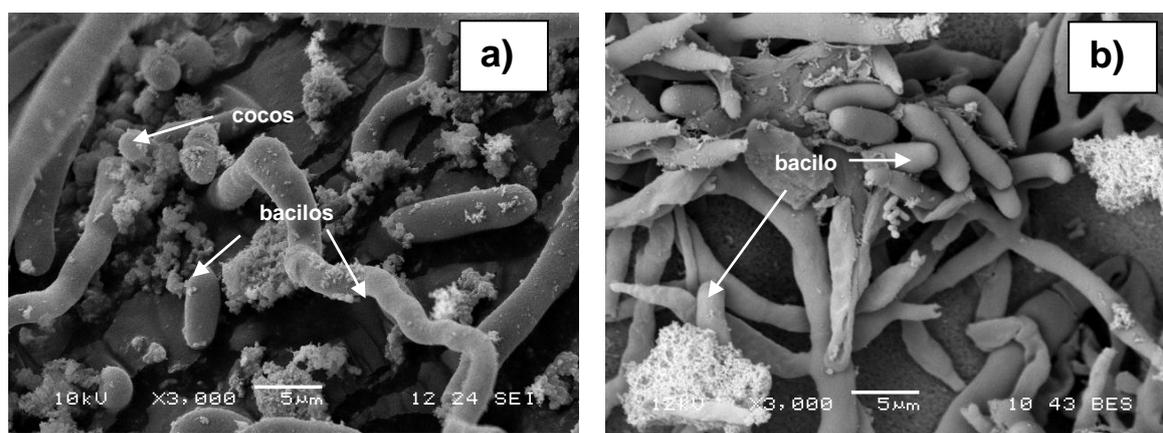


Figura 8. Micrografías del cultivo mixto proveniente de una muestra de petróleo. a) bacilos y cocos y b) bacilos.

6.1.1.4. Identificación de los metabolitos producidos por el cultivo mixto en el tercer enriquecimiento

La prospección de los metabolitos producidos por el cultivo mixto se llevo a cabo con diferentes concentraciones de sustrato. La figura 9 muestra los metabolitos producidos, se observa que el ácido acético es el que se encuentra en mayor proporción seguido por el etanol. Se puede observar que con la mayor concentración de sustrato (29.23 mM) se obtuvo la mayor producción de ácido acético (2.67 mM), pero no así para la producción de etanol, ya que este se produjo con una concentración inicial de sustrato de 14.61 mM, en el sistema control (medio de cultivo con muestra de petróleo), no se presento producción de alguno de los metabolitos. En el análisis cromatográfico de las muestras se observó la aparición de otros picos muy pequeños que no pudieron ser identificados.

Estos resultados coinciden con los reportados por Hao *et al* (2004) quienes reportaron una mayor producción de ácido acético (4.62 mM) con una cepa aislada de un aceite petrolero a 85 °C, y glucosa como fuente de carbono. Los autores mantuvieron la cepa en

cultivo por tres días y en nuestro caso se realizó el análisis de la producción de los metabolitos después de dos semanas, por lo que los metabolitos producidos por el cultivo mixto, pudieron haber sido consumidos por el mismo cultivo.

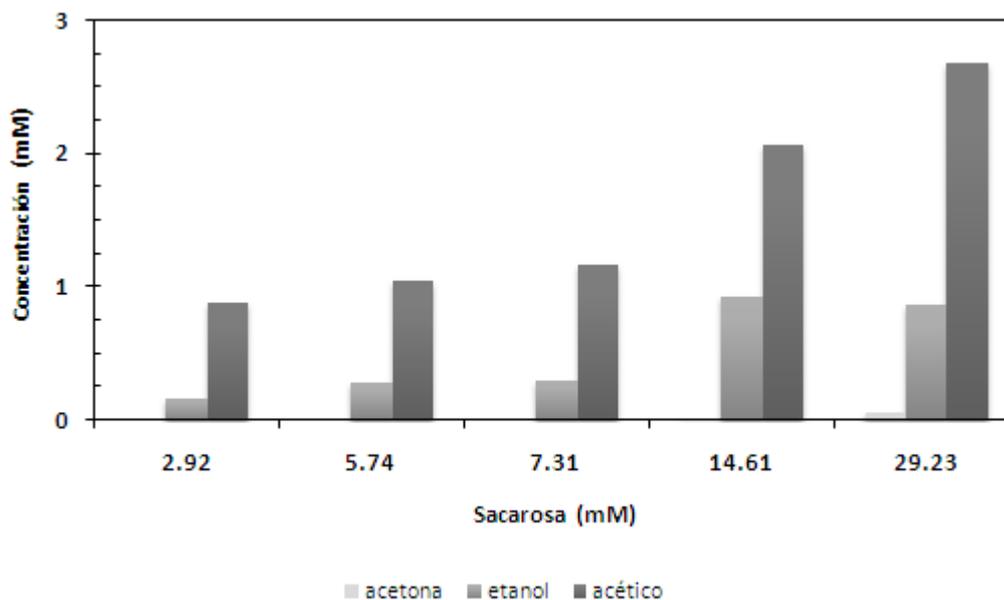


Figura 9. Metabolitos producidos por el cultivo mixto en el tercer enriquecimiento con diferentes concentraciones de sacarosa.

Por otro lado Tsai *et al.*, (1995); evaluaron los metabolitos producidos con una cepa aislada del lago salado de Utah, en la fermentación de glucosa, con una concentración de NaCl de 1.7 M encontrando metabolitos como: acetato, lactato, butirato, CO₂ e H₂, los cuales son importantes para el proceso de recuperación microbiana utilizando microorganismos fermentativos halófilos.

En este trabajo a partir de la fermentación de la melaza se produjeron principalmente ácido acético y etanol, pero se han reportado varios metabolitos más, producidos por bacterias fermentativas aisladas de yacimientos de petróleo tales como: ácido propiónico, acetona, etanol, 1-butanol, butanona, CO₂, CH₄ e H₂, los cuales ejercen ciertos cambios dentro de los yacimientos como: la re-presurización e incremento de la permeabilidad y la porosidad del mismo, por lo que se amplían las fisuras y los canales a través de la disolución de las rocas de carbonato del yacimiento, lo que contribuye con la liberación y recuperación del aceite atrapado en las rocas del yacimiento (Sen, 2008; Lazar, 2007).

6.2. Caracterización cinética del cultivo mixto

Se realizaron cinéticas en lote con diferentes concentraciones de sustrato con el objetivo de obtener parámetros cinéticos del cultivo mixto.

La figura 10 muestra el comportamiento del crecimiento microbiano medido indirectamente como proteína en función del tiempo. Se obtuvo el mayor crecimiento del cultivo mixto a una concentración inicial de sustrato de 74.64 mM.

En todas las concentraciones de sustrato el cultivo mixto alcanzó su fase estacionaria entre las 50 y 60 h de cultivo, a partir de este tiempo el cultivo mixto con todas las concentraciones de sustrato tuvo un crecimiento en forma asintótica hasta las 200 horas de cultivo.

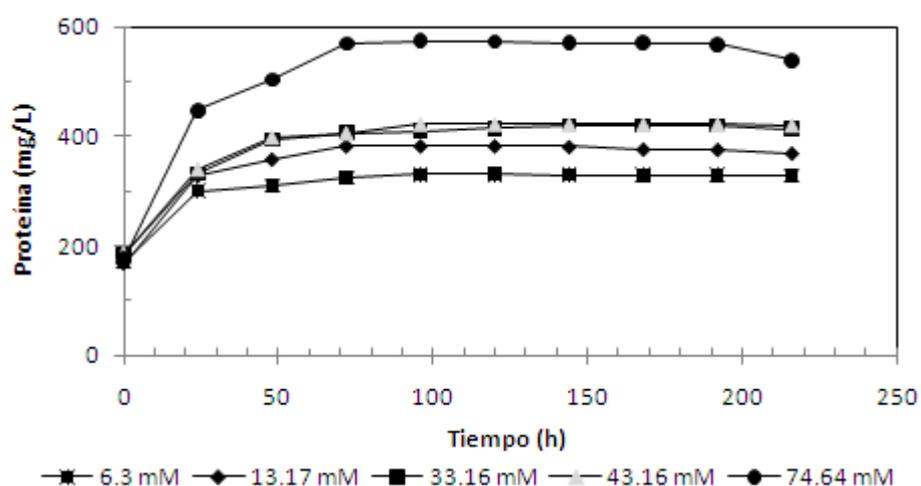


Figura 10. Crecimiento del cultivo mixto con diferentes concentraciones de sustrato.

6.2.1. Consumo de sustrato

La figura 11 muestra el comportamiento del consumo de sustrato (melaza), medido como sacarosa en función del tiempo. Se observa que no hubo un consumo total del sustrato en las concentraciones probadas, hasta un periodo de 200 h.

La cinéticas que presentaron una mayor velocidad de consumo de sustrato fueron las realizadas bajo una concentración de 74.64 y 43.56 mM de sacarosa con una velocidad de consumo de $q= 0.1779$ y 0.1762 mM/h respectivamente, estas dos velocidades fueron muy parecidas; la cinética que tuvo la menor velocidad de consumo de sustrato fue la de 6.3 mM de sacarosa con una velocidad de consumo de $q=0.0348$ mM/h (tabla 11).

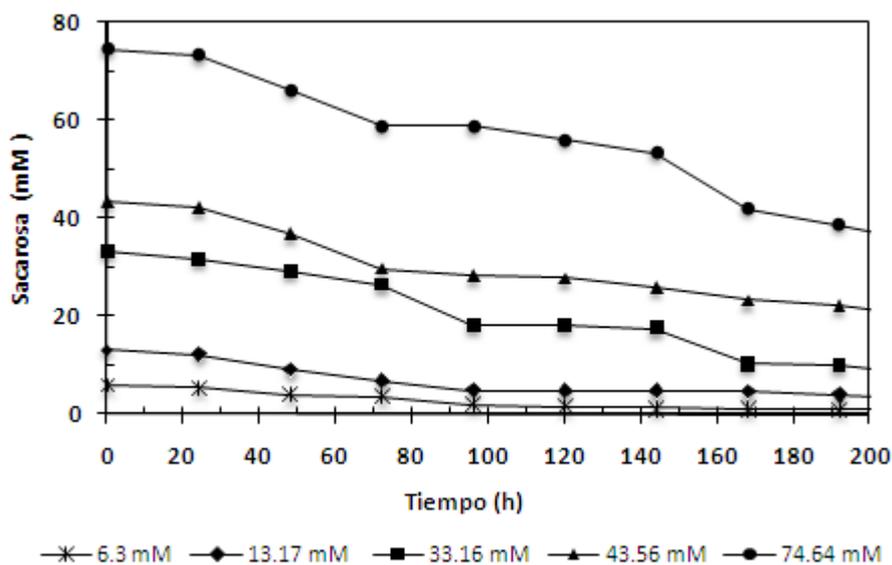


Figura 11. Consumo de sustrato por el cultivo mixto microbiano con diferentes concentraciones de sustrato.

Tabla 11. Velocidades de consumo de sustrato del cultivo mixto con diferentes concentraciones de sustrato.

Concentración de sustrato inicial (mM)	Velocidad de consumo de sustrato (mM/h)
6.3	0.0348
13.17	0.0919
33.16	0.1408
43.56	0.1762
74.64	0.1779

6.2.2. Producción de metabolitos

La figura 12 presenta la cinética de producción de etanol por el cultivo mixto a las diferentes concentraciones de sustrato probadas en función del tiempo. Se observa que la mayor producción de etanol fue de 27.24 mM a las 200 h corresponde a una concentración inicial de sustrato de 43.56 mM. La producción de este metabolito fue similar en casi todas las concentraciones ya que se produjeron de 25.70 a 26.30 mM de etanol. Otro de los metabolitos producidos fue el ácido acético, su máxima producción fue de 1.05 mM cuando se tuvo una concentración inicial de 74.64 mM de sustrato. Estos resultados fueron diferentes a los que se obtuvieron cuando el cultivo mixto estuvo en contacto con las primeras concentraciones de melaza (sustrato < 33.16 mM), en donde el metabolito principal fue el ácido acético con una concentración de 2.67 mM con una concentración de sustrato de 29.23 mM. Esto pudo deberse a que con las primeras concentraciones probadas se hizo el análisis de los metabolitos después de dos semanas de cultivo, y no se analizaron periódicamente como en el caso de la cinética; siendo quizás tiempo suficiente para que estos fueran consumidos por el mismo cultivo mixto.

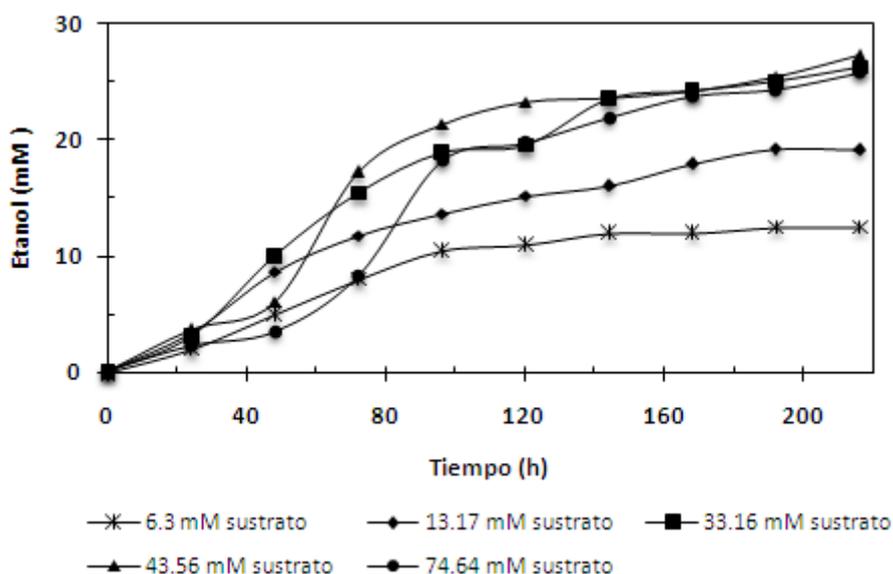


Figura 12. Producción de etanol con diferentes concentraciones de sustrato.

La figura 13 muestra el comportamiento de la producción de CO₂ a lo largo del tiempo de experimentación en las diferentes concentraciones de sustrato utilizado. Se observa que en todas las concentraciones de sustrato la producción de CO₂ comenzó a partir de las

20 horas y se estacionó a las 200 h. En la concentración de 33.16 mM de sustrato fue donde se obtuvo la mayor producción de CO₂, pero no sucedió lo mismo para la producción de biomasa ya que donde se favoreció más el crecimiento del cultivo fue con una concentración de sustrato de 74.64 mM, por lo que la producción de CO₂ pudo haberse inhibido por la concentración del sustrato.

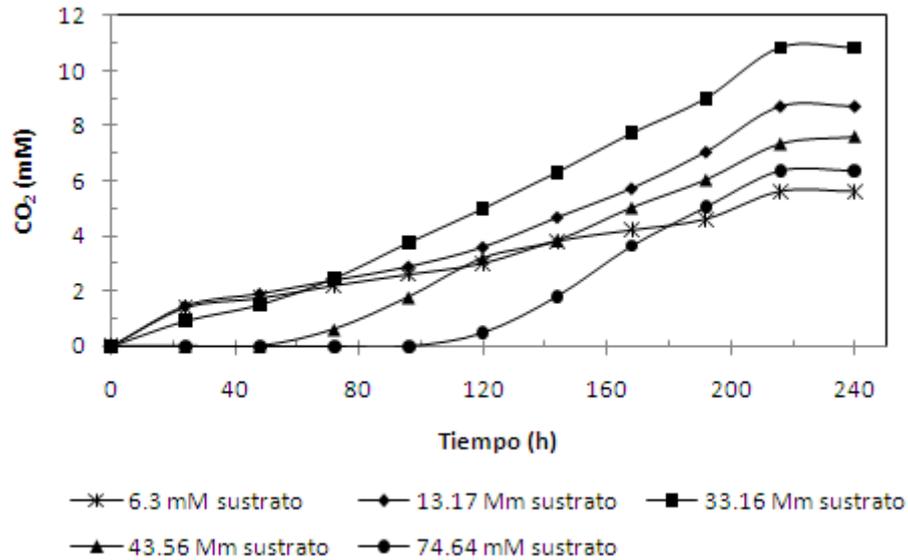


Figura 13. Producción de CO₂ con diferentes concentraciones de sustrato.

6.2.3. Determinación de parámetros cinéticos

Se evaluó la velocidad de consumo de sustrato y la producción de diferentes metabolitos por el cultivo mixto. Por lo que a partir de las cinéticas con diferentes concentraciones de sustrato se calcularon: la velocidad de crecimiento específica, velocidad de consumo de sustrato y velocidad de producción de metabolitos (figuras 14, 15, 16 y 17 respectivamente).

La figura 14 muestra la velocidad de crecimiento en función de las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas. Se observa que el crecimiento del cultivo es directamente proporcional a la concentración de sustrato evaluada hasta 15 mM y que a concentraciones más altas el crecimiento permanece constante. Se observa que la curva tiene un comportamiento típico de Monod.

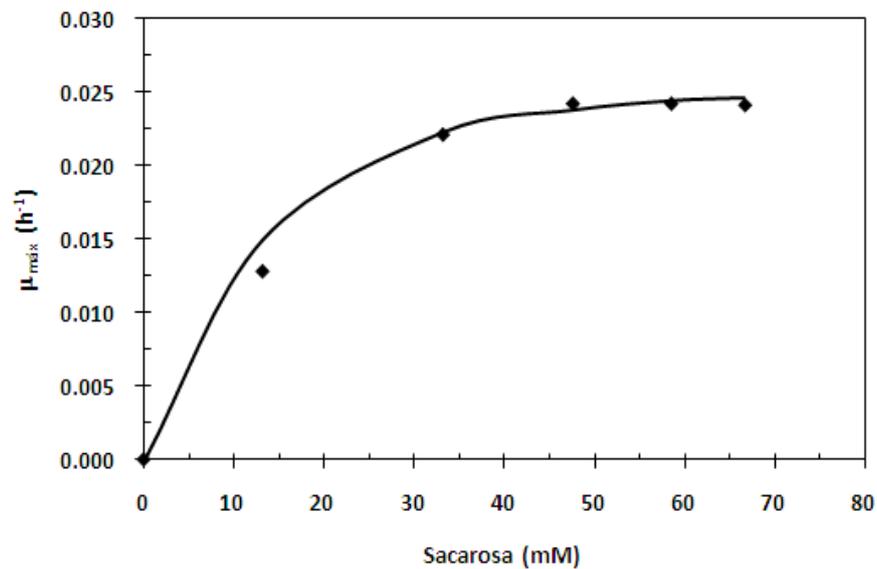


Figura 14. Velocidad de crecimiento del cultivo mixto en función de la concentración de sustrato.

La figura 15 muestra la velocidad de consumo de sustrato (sacarosa) en función de las diferentes concentraciones de sacarosa utilizadas. Se observa que la curva sigue el comportamiento típico de Monod en donde la concentración de sustrato es directamente proporcional a la velocidad de consumo de este, hasta tener 45 mM de sacarosa y después con concentraciones mayores la velocidad de consumo se mantiene constante. Para calcular la velocidad máxima de consumo se utilizó la ecuación de Monod descrita en la sección de materiales y métodos. Obteniendo una $\mu_{máx}$ de crecimiento de 0.0348 h⁻¹.

En la curva de Monod se observan dos etapas.

- En la primera etapa la velocidad es proporcional a la concentración de sustrato. Esta etapa se obtiene cuando la concentración de sustrato se acerca a K_s .
- En la segunda la concentración del sustrato es superior a K_s ($S \gg K_s$), entonces la velocidad de consumo del sustrato es constante, por lo que se alcanza la velocidad máxima.

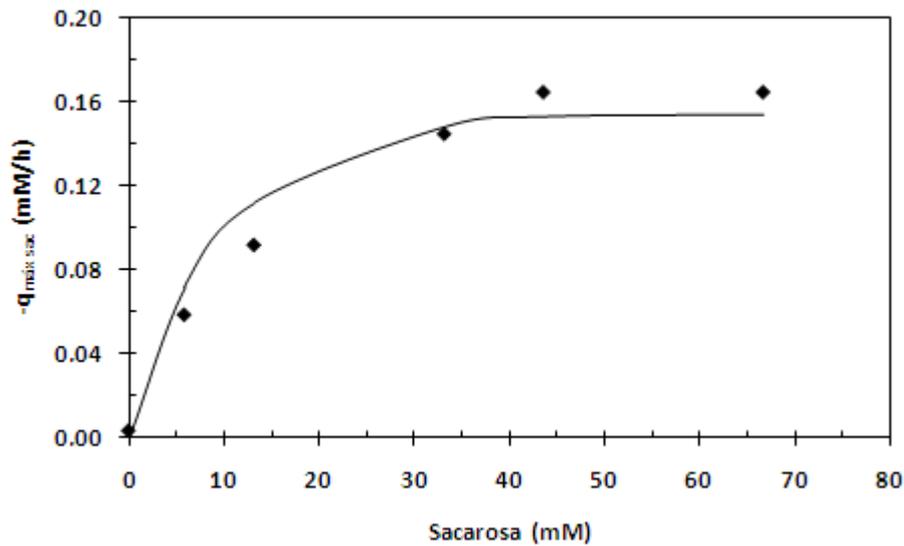


Figura 15. Velocidad máxima de consumo de sacarosa por el cultivo mixto, para la obtención de $q_{máx}$ y k_s .

En la figura 16 se muestra la velocidad de producción de etanol en función de las diferentes concentraciones de sacarosa utilizadas. Se observa que la velocidad de producción de etanol es directamente proporcional a la concentración de sacarosa utilizada hasta una concentración de 33 mM de sacarosa; y que después de esta concentración la velocidad de producción ya no cambia. La velocidad máxima de consumo de sustarto fue de 0.2295mM/h y la constante de finidad al sustrato fue de 23.29 mM.

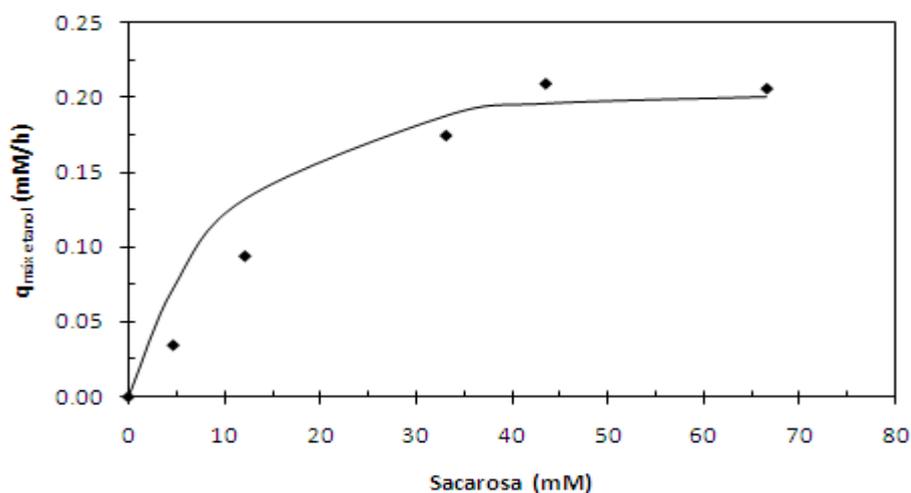


Figura 16. Velocidad de producción de etanol por el cultivo mixto.

En la figura 17 se observa la velocidad de producción de CO₂ en función de las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas. Se observa que a concentraciones por debajo de 33 mM de sacarosa la velocidad de producción de etanol es proporcional, mientras que a concentraciones mayores a esta la velocidad de producción de CO₂ permanece constante. La velocidad máxima de producción de etanol se calculó a partir de la ecuación de Monod, siendo de 0.242 mM/h.

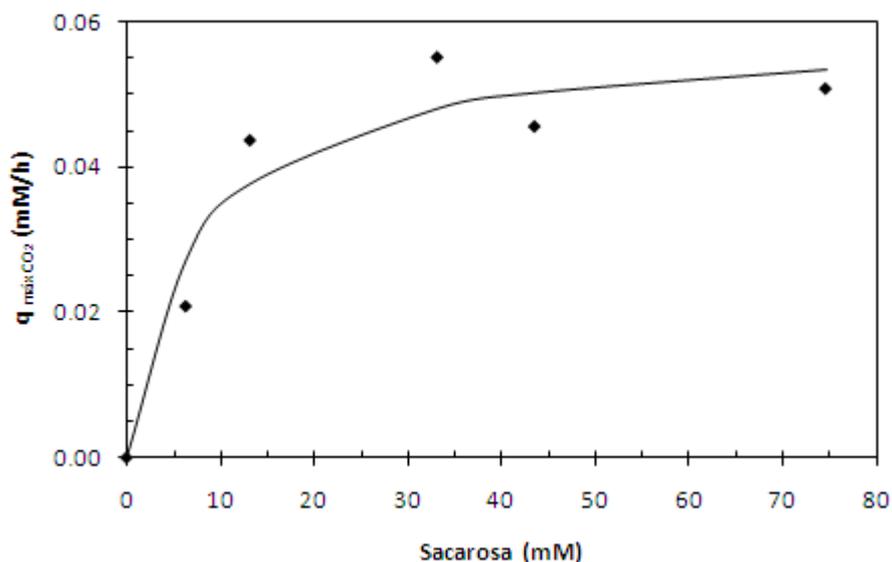


Figura 17. Velocidad de producción de CO₂ por el cultivo mixto.

Se observó que el crecimiento microbiano se estacionó a partir de una concentración de 33 mM de sustrato, el mismo comportamiento se obtuvo que para la producción de metabolitos.

El cultivo mixto de este trabajo aislado de la muestra de petróleo, se clasifica como un cultivo halotolerante ya que crece a una concentración de NaCl 0.85 M, además de ser un cultivo mixto fermentador al utilizar melaza como fuente de carbono. En la tabla 12 se mencionan los parámetros encontrados para este cultivo mixto.

En la literatura no se han encontrado parámetros cinéticos sobre cultivos mixtos o cepas puras a las condiciones de trabajo del estudio realizado. Por lo que es necesario realizar estudios al respecto considerando los siguientes factores ambientales temperatura, pH, concentración de NaCl, etc., los cuales nos puedan ayudar a entender un poco más el comportamiento de los microorganismos provenientes de algún yacimiento de petróleo o

algún suelo contaminado con aceite, y así dar una mejor aplicación a estos al utilizarlos para la tecnología MEOR o para tratamientos de bioremediación.

Tabla 12. Parámetros cinéticos del cultivo mixto con una concentración de NaCl 0.85 M.

Parámetro cinético	Valor
μ_{max}	0.0348 h ⁻¹
tiempo de duplicación (t_d)	19.91 h (0.83 d)
k_s	23.29 mM
$Q_{m\acute{a}x}$ consumo de sustrato	0.2295 mM/h
$Q_{m\acute{a}x}$ específica de consumo de sustrato	0.0012 mM/mg _{proteína} *h
$Q_{m\acute{a}x}$ producción de etanol	0.242 mM/h
$Q_{m\acute{a}x}$ específica de producción etanol	0.0015 mM/mg _{proteína} *h
$Q_{m\acute{a}x}$ de producción de CO ₂	0.06 mM/h
$Q_{m\acute{a}x}$ específica de producción CO ₂	0.00033 mM/ mg _{proteína} *h

6.3. Efecto del cultivo mixto sobre las características del crudo

Con el objeto de evaluar el efecto del cultivo mixto y la producción de metabolitos sobre las características del aceite crudo, se realizaron 3 tratamientos donde la diferencia entre ellos fue la adición de inóculo o cultivo mixto y la adición de sustrato, como se explicó en materiales y métodos.

En estos tratamientos se siguió el comportamiento del crecimiento microbiano (biomasa, análisis de proteínas), la producción de metabolitos y se comparó la composición del aceite utilizado al inicio y fin del experimento.

6.3.1. Biomasa

La figura 18 muestra el comportamiento de la biomasa en los tres tratamientos utilizados. Se observa que el mayor crecimiento microbiano (450 mg proteína/L) fue en el tratamiento 1, que contenía inóculo y melaza como fuente de carbono, además de aceite crudo. En los tratamiento 2 y 3, no se observó crecimiento microbiano, aun cuando el tratamiento 2 contenía inóculo. Por lo que se deduce que los microorganismos provenientes del cultivo mixto, utilizaron principalmente la fuente de carbono más fácil de degradar y fermentar (melaza) (tratamiento 1). En el tratamiento 2 se observa un crecimiento moderado, aproximadamente de 200 mg de proteína/L, por lo que es posible

que los microorganismos inoculados utilizaron algunos componentes de crudo para su crecimiento. El crecimiento del tratamiento 3 fue ligeramente menor al del tratamiento 2 por lo que es posible que los microorganismos que crecieron en este tratamiento son los provenientes del aceite, ya que este no fue esterilizado y los microorganismos autóctonos pudieron ser los responsables de la biodegradación o bioconversión del aceite crudo.

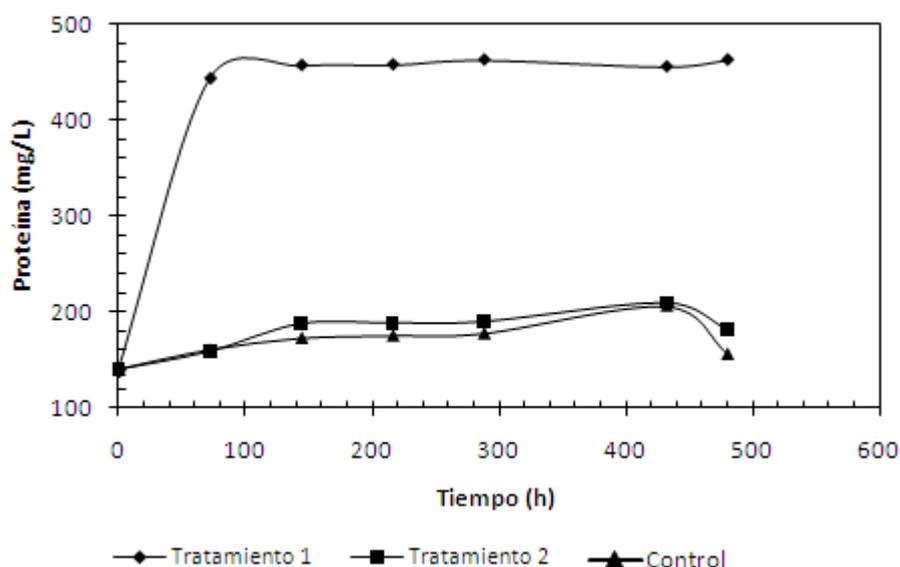


Figura 18. Crecimiento microbiano en cada uno de los tratamientos y el control.

6.3.2. Producción de metabolitos.

La figura 19A muestra la producción de los principales metabolitos producidos a lo largo del tiempo en los tres tratamientos. Se observa que la mayor producción de estos se tuvo en el tratamiento 1, el ácido acético fue el metabolito que se produjo en mayor concentración (10.75 mM); mientras que para el tratamiento 3 sólo se produjeron 3.52 mM. En cuanto a la producción de etanol, se observó que únicamente en el tratamiento 1 se generó etanol con una concentración de 4.44 mM (fig. 19B), este metabolito no se encontró en los tratamientos 2 y 3. Esto pudo deberse a que el T1 tenía melaza como fuente de carbono, la cual es más fácil de asimilar que el aceite crudo. También se detectó la producción de acetona, ácido propiónico y butírico en los tres tratamientos, sin embargo las concentraciones fueron muy bajas, 1 mM de acetona para T2 y de 6 mM para T1. El ácido propiónico y butírico solamente se produjo en el T1 con una producción de 0.01 y 0,1mM respectivamente.

Los resultados de este trabajo son parecidos a los de Hao et al, (2004), ya que uno de los principales metabolitos del cultivo mixto fue el ácido acético (10.75 mM al final del tiempo de cultivo), y para estos autores este metabolito fue el que se produjo mayormente; sin embargo a los 5 días de cultivo la concentración de este metabolito fue de 5.5 mM en este trabajo, mientras que para Hao et al fue de 4.61 mM de ácido acético. En el crecimiento microbiano no ocurre lo mismo, ya que en nuestro caso, se alcanzó el máximo crecimiento del cultivo después de las 60 h de cultivo, esto debido a los factores ambientales ya que fueron diferentes a los que probaron los autores anteriormente mencionados.

Se ha reportado que bacterias fermentativas como *Clostridium*, *Enterobacter*, *mixed Acidogens*, producen ácidos y bacterias como *Clostridium*, *Zymomonas*, *Klebsiella*, producen solventes; este tipo de metabolitos dentro de los yacimientos mejoran la permeabilidad de la roca carbonada al disolver y reducir la viscosidad del aceite y el grado de emulsificación, tal y como se menciona en la tabla 2.

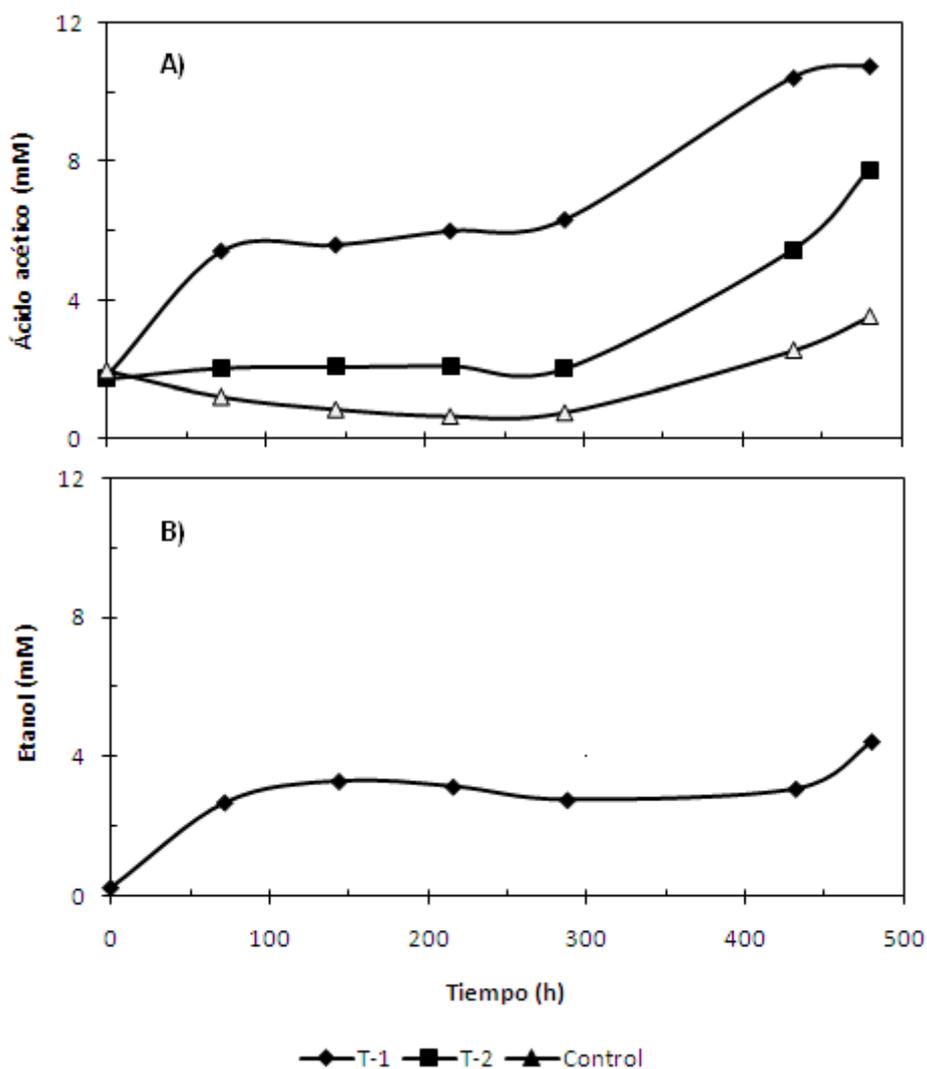


Figura 19. Producción de ácido acético en los dos tratamientos del crudo (A) y producción de etanol en el tratamiento 1 (B), con el cultivo mixto

6.3.3. Cambio en la composición del aceite crudo después de cada uno de los tratamientos

El cambio en la composición del aceite crudo se llevó a cabo por medio de cromatografía de gases. Una forma de saber que tanto cambio la composición total del aceite es por medio de la concentración de hidrocarburos totales (HTP), esto se puede observar en la figura 20, en donde se observa esta concentración de hidrocarburos totales tanto en el aceite original (o), como en los tratamientos realizados con el cultivo mixto y el control. El tratamiento 1 (T1) contenía el medio de cultivo, aceite, cultivo mixto y melaza, el tratamiento 2 (T2) se diferenció con el anterior por no contener melaza y el control solo

contenía el aceite más el medio de cultivo (T3). Se observó que el T1 fue el que tuvo una mayor disminución en la concentración de los hidrocarburos totales (32%), esto debido a la acción de los microorganismos provenientes del cultivo mixto. Para T2 y T3 solamente se redujo (20%) de la concentración total de hidrocarburos, sin una fuente adicional de carbono lo que indica que el cultivo mixto tuvo la capacidad de degradar los hidrocarburos, además produjo metabolitos al fermentar el sustrato (melaza).

Debido a que el aceite no se esterilizó hubo microorganismos autóctonos que contribuyeron a la degradación de los mismos.

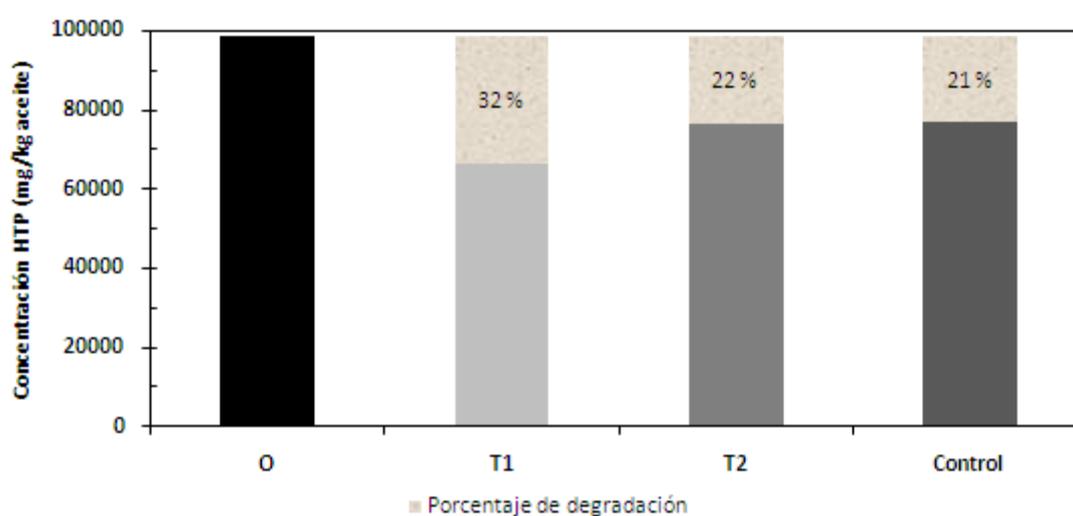


Figura 20. Hidrocarburos totales del aceite crudo original, los dos tratamientos y el control.

Este trabajo es parecido a lo reportado por Sugiura et al. (1997); quienes realizaron un estudio de biodegradación con cuatro diferentes aceites y obtuvieron un 19-34% de degradación después de 28 días de cultivo, y en nuestro caso fue de 21-32% de degradación después de 20 días de cultivo.

La velocidad de biodegradación de los hidrocarburos por microorganismos está determinada por varios factores ambientales además del tipo de compuestos presentes en cada aceite.

Para tener más detalle de los hidrocarburos que sufrieron algún cambio se hizo un análisis por composición de carbono desde C_8 a C_{26} , en la figura 21 se muestra esta composición del aceite, los otros hidrocarburos no se pudieron analizar con los diferentes

tratamientos, se observa que en los tres tratamientos hubo una reducción de los alcanos, en el rango de C_8 - C_{11} el tratamiento que presentó una mayor disminución fue el tratamiento 1 y el que menos disminuyó fue el tratamiento 3 con un porcentaje de reducción de 46 y 34% respectivamente. Esto se puede explicar porque los alcanos ligeros son los más fáciles de degradar tanto por los microorganismos fermentadores provenientes del cultivo mixto y por los microorganismos autóctonos provenientes del aceite crudo. En el rango de C_{12} - C_{17} el porcentaje de disminución de los alcanos fue menor, sin embargo se observa un decremento de 31% en el T1 y para los tratamientos 2 y 3 el porcentaje de disminución fue del 21%. En el rango de C_{18} - C_{22} y de C_{23} - C_{26} el porcentaje de disminución de los alcanos más pesados es todavía mucho menor, por debajo de 30%.

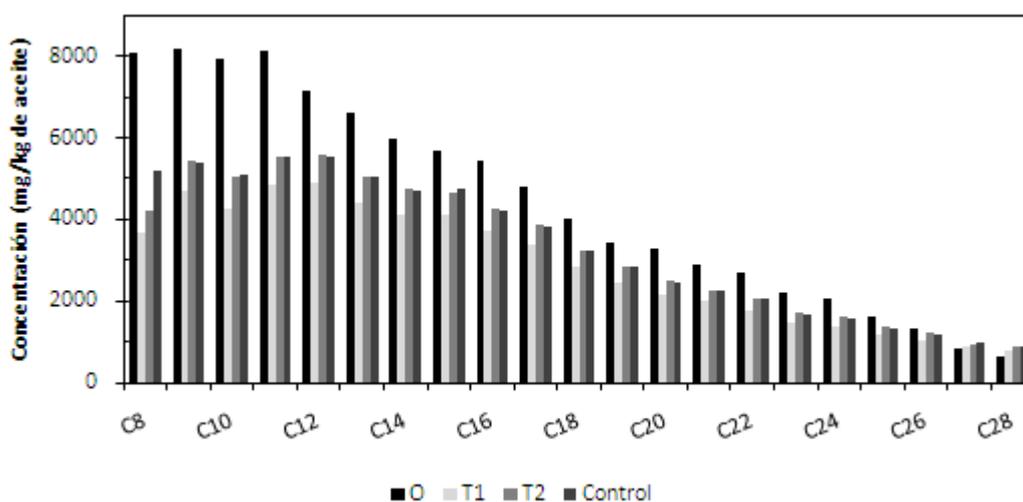


Figura 21. Composición de carbono del aceite crudo original, los dos tratamientos y el control.

Se ha mencionado que la bioconversión del crudo depende de la distribución relativa de los compuestos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos, y de la distribución de compuestos polares que contienen heteroátomos como N, S, O y de metales traza (Premuzic and Lin, (1999) y Tango and Islam, (2002)).

Gudiña et al, (2012); aislaron e identificaron microorganismos con capacidad de degradar alcanos de C_{18} - C_{24} en condiciones aerobias y alcanos de C_{18} y C_{20} tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Hao and Wang, (2003); en un estudio de biodegradación con una cepa termofílica encontraron que los alcanos de C_7 - C_{10} y de C_{10} - C_{15} aumentaron

alrededor del 10 y 15% respectivamente, mientras que la fracción de hidrocarburos de C_{20} - C_{25} disminuyó más del 50%. Sugiura et al, (1997); realizaron un experimento con cuatro tipos de aceite con una cepa (*Acinetobacter* sp T4) y con un consorcio microbiano (llamado SM8); encontraron que en dos (Dubai y Árabe ligero) aceite se degradó el 100% de los hidrocarburos de C_{14} - C_{26} con el consorcio SM8 y *Acinetobacter* sp T4. Hao et al. (2004); en un estudio de biodegradación a cuatro diferentes tipos de aceite crudo con una cepa termofílica (TH-2) encuentran que la cepa degradó diferentes fracciones de los hidrocarburos, de C_{10} - C_{15} aumentaron del 12-35%, mientras que los de C_{15} - C_{20} aumentaron de 7-50% en el contenido de estos hidrocarburos. Los hidrocarburos de C_{20} - C_{25} presentaron una disminución de 39-76%. Los resultados anteriores concuerdan con los encontrados con la biodegradación del cultivo mixto, ya que con el T1 se degradaron los alcanos totales más ligeros (C_8 - C_{11}) y también la fracción de hidrocarburos de C_{18} - C_{26} con el 46 y 30% de degradación respectivamente, por lo que los alcanos más ligeros fueron los más fáciles de biodegradar.

Conocer las características de crecimiento de los microorganismos y sus productos metabólicos, no da la certeza de que este microorganismo pueda ser usado en cualquier reservorio para mejorar la recuperación del aceite, ya que las condiciones de cada reservorio es diferente; pero si nos da un acercamiento del tipo de microorganismos que pueda haber en los reservorios, así como del posible comportamiento de estos dentro del reservorio.

Los cambios en los hidrocarburos totales y la composición de carbono del aceite con los dos tratamientos y el control, así como la muestra original son más fácil de apreciar mediante un cromatograma. La figura 22 muestra los cromatogramas de aceite original sin tratar (A) y el cromatograma de T1 (B), se observa que los alcanos ligeros desaparecen inmediatamente (tiempo de retención 15 minutos), algunos disminuyen su concentración (tiempo de retención >15 minutos).

En la figura 23 y 24 se observan los cromatogramas de los tratamientos 2 y 3 junto con sus respectivos cromatogramas del aceite original, y en este caso los alcanos ligeros disminuyen ligeramente y los demás hidrocarburos despues del tiempo 25 permanecen casi igual. Lo que concuerda con lo que observado en la figura 22 que muestra la composición detallada de hidrocarburos y se observa que hasta C_{26} hubo una importante disminución de hidrocarburos debido a la bioconversión de los mismos por los

microorganismos provenientes del cultivo mixto. Comparando los cromatogramas de los tres tratamientos se observa que el tratamiento 1 tiene un mayor cambio en la composición de los hidrocarburos. La biodegradación del petróleo se favorece más cuando se agrega un inóculo y fuentes de carbono externos. Esto muestra que el cultivo mixto favoreció la degradación del crudo.

El cultivo mixto obtenido en este trabajo tiene el potencial de recuperación de hidrocarburos.

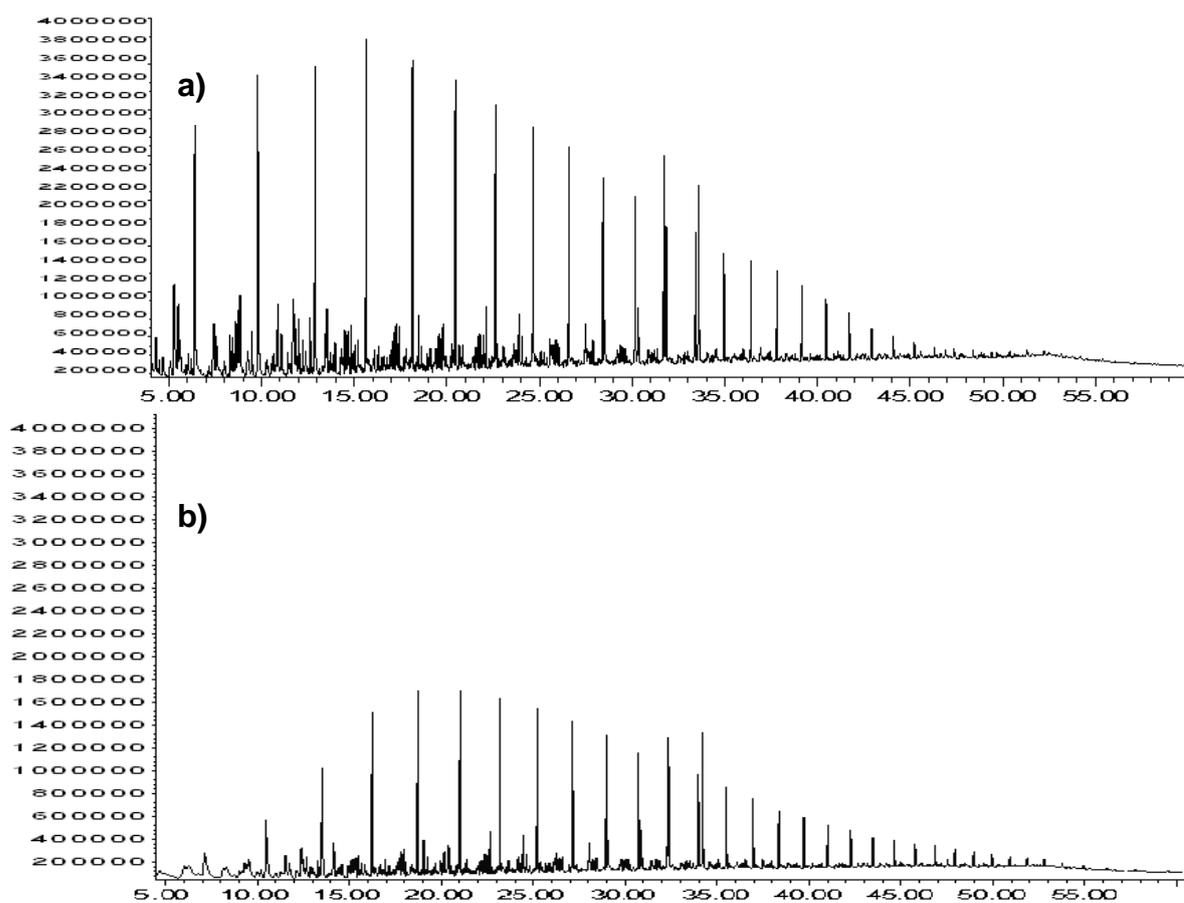


Figura 22. Cromatogramas de la muestra de aceite original (a) y T-1 (b).

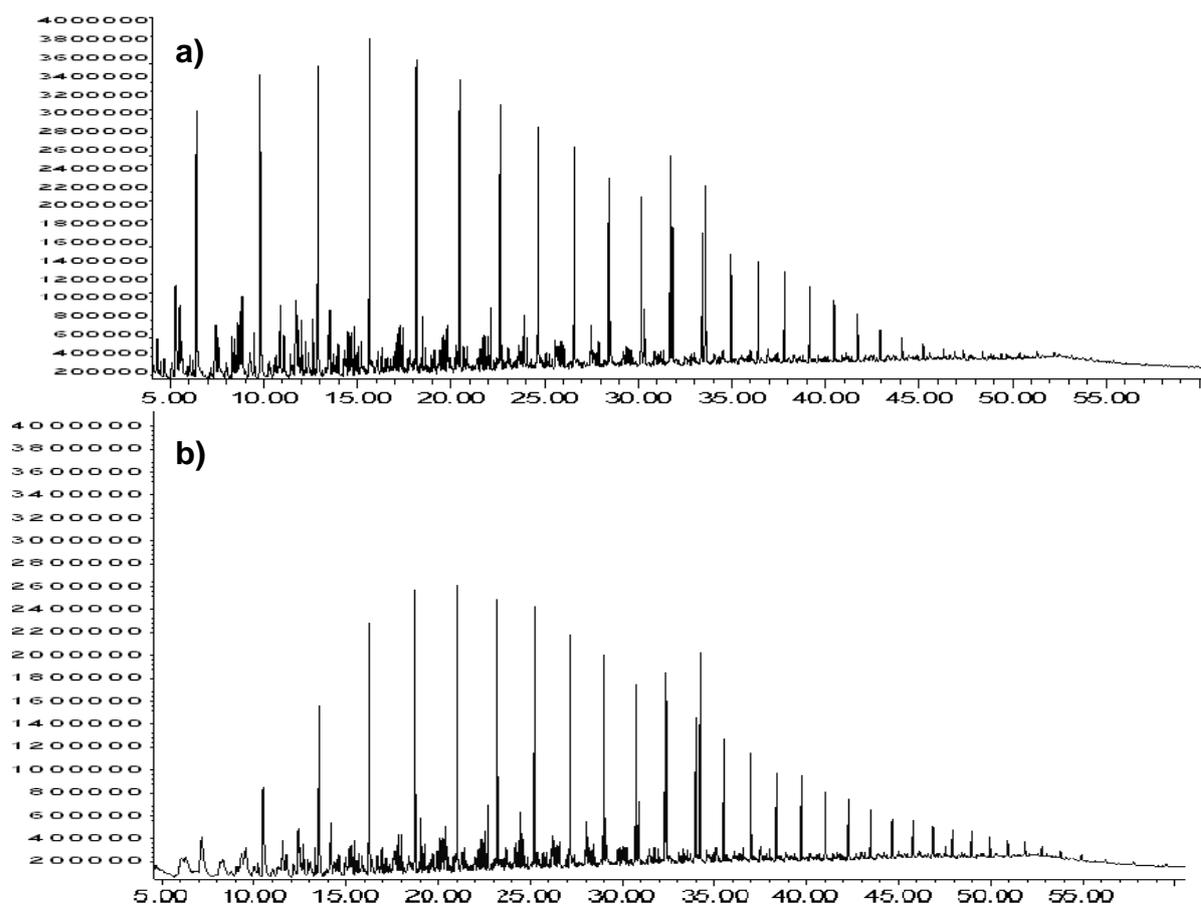


Figura 23. Cromatogramas de la muestra de aceite original (a) y T-2 (b).

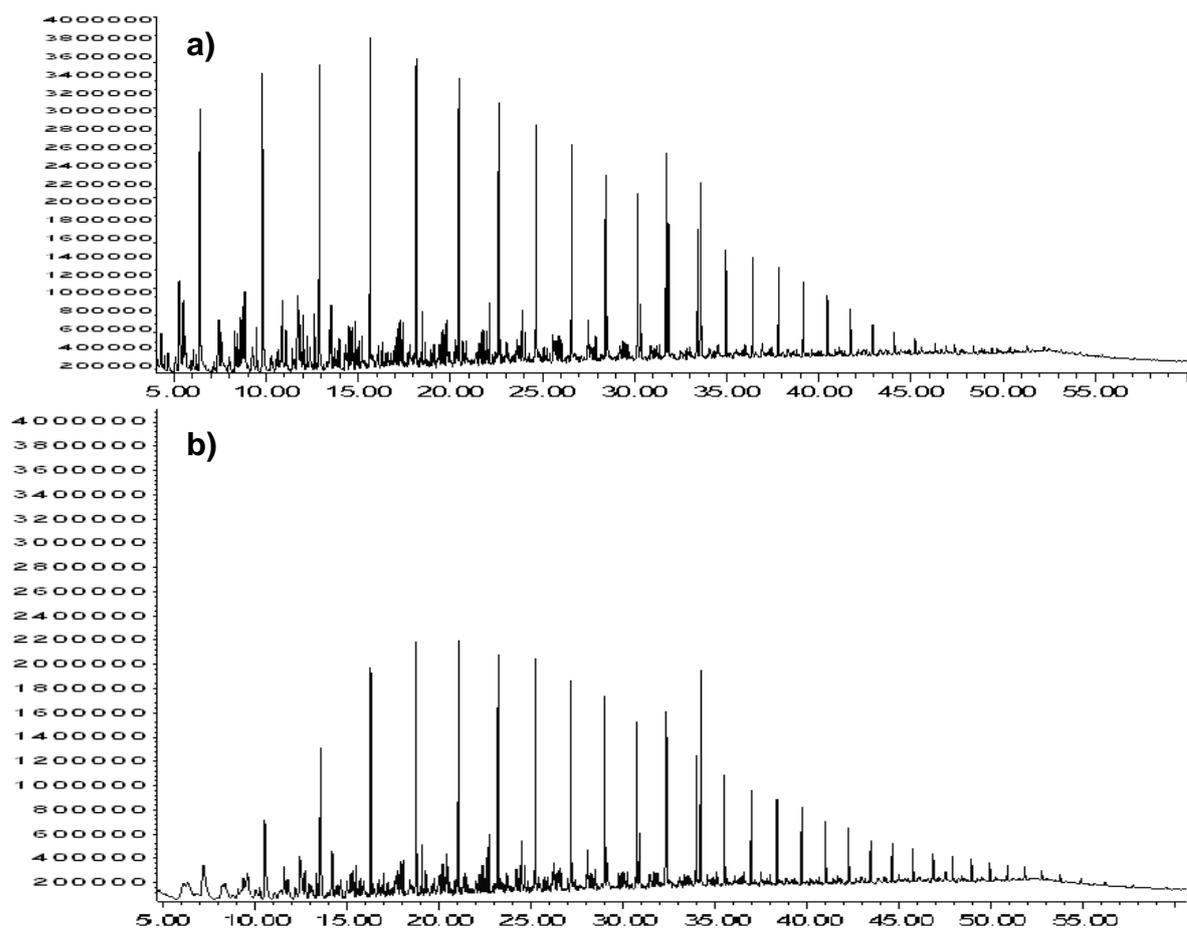


Figura 24. Cromatogramas de la muestra de aceite original (a) y control (b).

8. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar estudios con el cultivo mixto para encontrar las condiciones optimas, tales como pH, T, salinidad, C/N y oxígeno.
- Se recomienda hacer estudios con diferentes tipos de aceite y el cultivo mixto, para observar el efecto de éste sobre las diferentes fracciones de los hidrocarburos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aladasani A. and Bai B. 2010. Recent developments and updated screening criteria of enhanced oil recovery techniques. Society of Petroleum Engineers 130726.
2. Alexander M. 1994. Biodegradation and Bioremediation, Ed. Academic Press, Reino Unido, pp. 1-7.
3. Atlas R. 1891. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiological Reviews. 45 (1): 180-209
4. Atlas R. 1984. Petroleum Microbiology. Ed. Macmillan Publishing Co., New York, 446-448.
5. Atlas R. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills, J. Chem. Technol Biotechnol. 52, 149-156.
6. Banat M., Ollivier B. and Bharat K. 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. Antonie van Leeuwenhoek. 77, 103–116.
7. Bhupathiraju, V., McInerney, M., Woese, C., and Tanner R. (1999). *Haloanaerobium kushneri* sp. nov., an obligately halophilic, anaerobic bacterium from an oil brine. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 953–960.
8. Bhupathiraju, V. K., Oren, A., Sharma, P. K., Tanner, R. S., Woese, C. R., and McInerney, M. J. 1994. *Haloanaerobium salsugo* sp. nov., a moderately halophilic, anaerobic bacterium from a subterranean brine. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 565–572.
9. Birkeland N. 2005. Sulfate-reducing bacteria and archaea. In “Petroleum Microbiology” (Ollivier B and Magot M., Eds.), 35–54. ASM, Washington, DC.
10. Bordoloi N.K. and Konwar B.K. 2009. [Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons](#). Journal of Hazardous Materials 170 (1): 495-505.
11. Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72 (1-2): 248-254.
12. Brock T.D. 1969. Microbial growth under extreme conditions. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 15-42
13. Bryant SR. 1987. Potential uses of microorganisms. Petroleum Recovery Technol Proc Okla Acad Sci 67, 97–104.
14. Castorena-Cortes et al. 2012. Evaluation of indigenous anaerobic microorganisms from Mexican carbonate reservoirs with potential MEOR application. Journal of Petroleum Science and Engineering 81, 86–93.

15. Cayol J., Ollivier B., Patel B., Ravot G., Magot M., Ageron E., Grimont P., and Garcia, J. 1995. Description of *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *lactiethylicus* subsp. nov., isolated from a deep subsurface French oil well, a proposal to reclassify *Thermoanaerobacter finnij* as *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finnij* comb. nov., and an emended description of *Thermoanaerobacter brockii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 783–789.
16. Cayol J., Fardeau M., Garcia J. and Ollivier B. 2002. Evidence of interspecies hydrogen transfer from glycerol in saline environments. Extremophiles 6, 131–134.
17. Chang H, Abdulrazag Z, Khaled El-Tarabily. 2009. Microbes enhanced oil recovery through various mechanisms. Oil and Gas Journal 31, 39-43.
18. Cobeñas R., Hogg S., Valdez R. and Hogg S. 2008. Mejoramiento de la producción de petróleo mediante el uso de aplicaciones biotecnológicas.
19. Davey M., Wood W., Key R. and Nakamura K. 1993. Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: Two new genera, representing a new lineage in the bacterial line of descent distantly related to the “*Thermotogales*.” Syst. Appl. Microbiol. 16, 191–200.
20. Davydova-Charakhch'yan I., Mileeva A., Mityushina L. and Belyaev S. 1992. Acetogenic bacteria from oil fields of Tataria and western Siberia. Microbiology (Eng. Tr.) 61, 306–315.
21. Dubois Michel, Gilles K., Hamilton J., Rebers P. and Smith Fred. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 (3): 350-356.
22. Durán U, Gómez J, Monroy O, Ramírez F. 2011. The effect of vinyl acetate in acetoclastic methanogenesis. Bioresource Technology 102, 1644-1648.
23. Euzéby, J. P. (2008). List of prokaryotic names with standing in nomenclature; Available from <http://www.bacterio.cict.fr/>.
24. EPA 8015. 1997. Test methods for petroleum hydrocarbons, Aliphatic and aromatic hydrocarbons; nonhalogenated VOC's.
25. Fardeau M., Salinas M., L'Haridon S., Jeanthon C., Verhe F., Cayol J., Patel B. , Garcia J. and Ollivier B. 2004. Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: Reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 467–474.

26. Foght J., Semple K., Gauthier C., Wetlake DWS, Blenkinsopp S., Wang Z., Fingas M. 1999. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. *Environ. Technol.* 20, 839-849.
27. Fratesi SE. 2002. Distribution and morphology of bacteria and their byproducts in microbial enhanced oil recovery operations. MS thesis, Mississippi State University.
28. Gerhard Philipp et al. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for microbiology. Washington, DC
29. Grassia G., McLean K., Glenat P., Bauld J. and Sheehy A. 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21, 47–58.
30. Gudiña E., Pereira J., Rodrigues L., Coutinho J. and Teixeira J. 2012. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 68, 56-64.
31. Hao R., and Wang G. 2003. Coreflood Experiment of Heavy Oil by *Thermus* SP3. *Journal of Canadian Petroleum Technology.* 3, 36-39.
32. Hao R., Lu A. and Zeng Y. 2004. Effect on crude oil by thermophilic bacterium. *Journal of petroleum science and engineering.* 43, 247-258.
33. Heath J., Coblas K. and Sager S. 1993. Review of chemical, physical and toxicologic properties of components of total petroleum hydrocarbons. *J. Soil. Cont.,* 2 (1): 1-25.
34. Horikxosi K. 1997. A new microbial world-Extremophiles. *Extremophiles* 1: 1
35. Kalish P., Stewart J., Rogers W. and Bennett E. 1964. The effect of bacteria on sandstone permeability. *J Petrol Technol* 805–13.
36. Khire J. and Khan M. 1994a. [Microbially enhanced oil recovery \(MEOR\). Part 1. Importance and mechanism of MEOR.](#) *Enzyme and Microbial Technology.* 16 (2): 170-172.
37. Khire J. and Khan M. 1994b. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 2. Microbes and the subsurface environment for MEOR. *Enzyme and Microbial Technology.* 16, 258-259.
38. Komukai-Nakamura S., Yamauchi T., Inomata Y., Venkateswaran K., Yamamoto S. and Harayama S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 570-574.

39. Kushner D. and Kamekura M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. En: Halophilic bacteria. Rodriguez-Valera, F. (Ed), 109-138. CRC Press. Boca Raton, USA.
40. Lazar I. 2007. [Microbial Enhanced Oil Recovery \(MEOR\)](#). Petroleum Science and Technology, 25 (11): 1353 – 1366.
41. Lazar I., Dobrota S., Voicu A., Stefanescu M., Sandulescu L., Petrisor I. 1999. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. Journal of Petroleum Science and Engineering 22, 151-160.
42. Leu J., McGovern-Traa C., Porter A. and Hamilton W. 1999. The same species of sulphate-reducing *Desulfomicrobium* occur in different oil field environments in the North Sea. Lett. Appl. Microbiol. 29, 246–252.
43. L'Haridon S., Miroshnichenko M., Hippe H., Fardeau M., Bonch-Osmolovskaya E., Stackebrandt E, and Jeanthon C. 2001. *Thermosipho geolei* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1327–1334.
44. L'Haridon S., Miroshnichenko M., Hippe H., Fardeau M., Bonch-Osmolovskaya E., Stackebrandt E. and Jeanthon C. 2002. *Petrotoga olearia* sp. nov. and *Petrotoga sibirica* sp. nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1715–1722.
45. L'Haridon S., Reysenbach A., Glenat P., Prieur D. and Jeanthon C. 1995. Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. Nature 377: 223–224.
46. Lien, T., and Beeder, J. 1997. *Desulfobacter vibrioformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 1124–1128.
47. Lien T., Madsen M., Rainey F. and Birkeland N. 1998a. *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1007–1013.
48. Lien T., Madsen M., Steen I. and Gjerdevik K. 1998b. *Desulfobulbus rhabdoformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 469–474.
49. Madigan M., Martinko J. and Parker J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Editorial Prentice Hall. pp. 1011. Capítulo 6 y 30.
50. Magot M et al. 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. 77, 103-116.
51. Magot M., Caumette P., Desperrier J., Matheron R., Dauga C., Grimont F. and Carreau L. (1992). *Desulfovibrio longus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an oil-producing well. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 398–403.

52. Magot M., Ravot G., Campaignolle X., Ollivier B., Patel B., Fardeau M., Thomas P., Crolet J. and Garcia J. 1997b. *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 818–824.
53. Magot M., Basso O., Tardy-Jacquenod C. and Caumette P. 2004. *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderately halophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1693–1697.
54. Malik Z and Ahmed S. 2012. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *African Journal of Biotechnology.* 11(3): 650-658
55. Mansoori G. 1998. Arterial blockage en the petroleum and natural gas industries-heavy organics deposition from petroleum fluids. Publicado en internet, http://www.uic.edu/~mansoori/HOD_html
56. Margesin R and Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotecnology. *Extremophiles.* 5 (2): 73-83.
57. McInerney M. and Westlake D. 1990. Microbial enhanced oil recovery. In: *Microbial Mineral Recovery* (Ehrlich, H. I. and Brierley, C. L., eds.) McGraw-Hill, New York. 409-455.
58. Miranda-Tello E., Fardeau M., Joulian C., Magot M., Thomas P., Tholozan J. and Ollivier B. 2007. *Petrotoga halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 40–44.
59. Miranda-Tello E., Fardeau M., Thomas P., Ramirez F., Casalot L., Cayol J., Garcia J. and Ollivier B. 2004. *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 169–174.
60. Nazina T, Sokolova D, Grigor'yan A, Xue Y, Belyaev S, Ivanov M. 2003. Production of oil-releasing compounds by microorganisms from the Daqing Oil Field, China. *Microbiology* 72, 173–8.
61. Olguín-Lora P., Le Borgne S., Castorena-Cortes G., Roldán-Carrillo T., Zapata-Peñasco I., Reyes-Avila. And Alcántara-Perez. 2011. Evaluation of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing microorganisms with potential application in the effluent treatment of the petroleum industry. *Biodegradation* 22, 83–93.

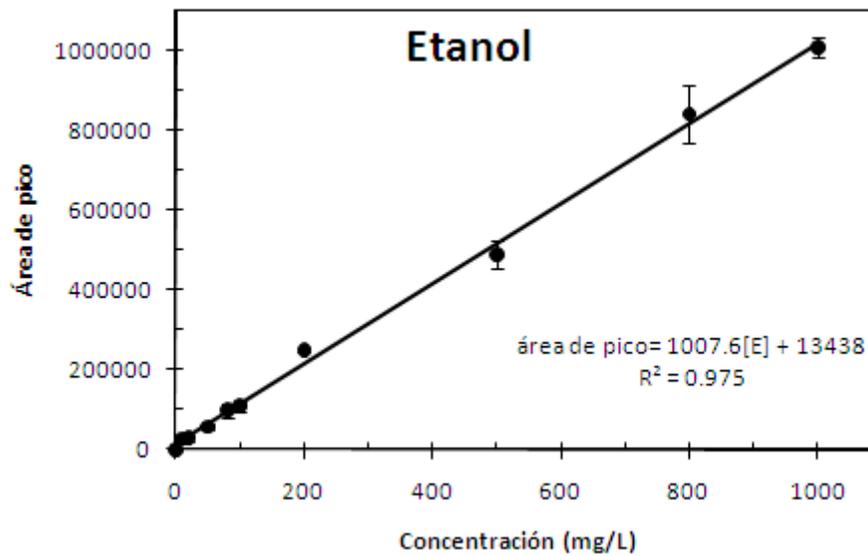
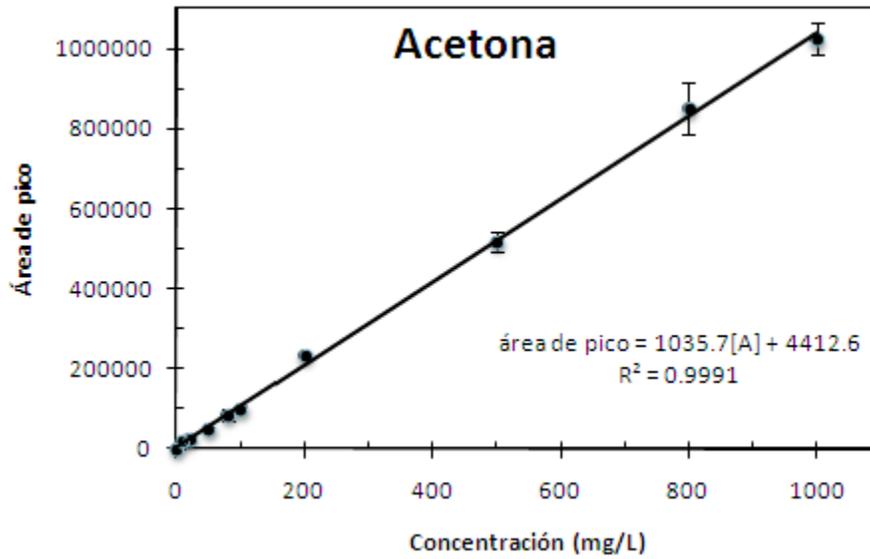
62. Ommedal H. and Torsvik T. 2007. *Desulfotignum toluenicum* sp. nov., a novel toluene degrading, sulphate-reducing bacterium isolated from an oil-reservoir model column. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2865–2869.
63. Ono K, Fujiwara K, Enomoto H. 2003. MEOR/MIOR field applications biotechnological know—how is key to the success. In: Proceedings of the 13th RIPI congress on improved oil recovery, Iran. Website: [/http://www.ripi.ir/en/congress13/meor.pdf](http://www.ripi.ir/en/congress13/meor.pdf).
64. Pantaroto de Vasconcellos S., Xrespin E., Feitosa da Cruz G., Barbosa S., Marques S., Vaz dos Santos N., Marsaioli A. and Maia de Oliveira V. 2009. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry* 40, 574–588.
65. PEMEX. 2011. Hydrocarbon reserves of Mexico, January 1st, 2011. Pemex, Mexico. 1-52 (In Spanish). <http://www.ri.pemex.com/files/content/libro%202009.pdf>.
66. Peihui H., SPE., Fengrong and Mei S. 2001. SPE 72128.
67. Premuzic E. and Lin M. 1999. Induced biochemical conversions of heavy crude oils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 22, 171–180
68. Ramírez N., Sandoval A. and Serrano J. 2004. Las bacterias y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*. Vol.24.
69. Ravot G., Magot M., Fardeau M., Patel B., Thomas P., Garcia J. and Ollivier B. 1999. *Fusibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1141–1147.
70. Ravot G., Magot M., Ollivier B., Patel B., Ageron E., Grimont P., Thomas P. and Garcia J. 1997. *Haloanaerobium congolense* sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium from an African oil field. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 81–88.
71. Röling W., Head I. and Larter S. 2003. [The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects](#). *Research in Microbiology* 154 (5): 321-328
72. Salager J. 2005. Recuperación mejorada del petróleo. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.
73. Sen R. 2008. [Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR](#). *Progress in Energy and Combustion Science*, 34 (6): 714-724

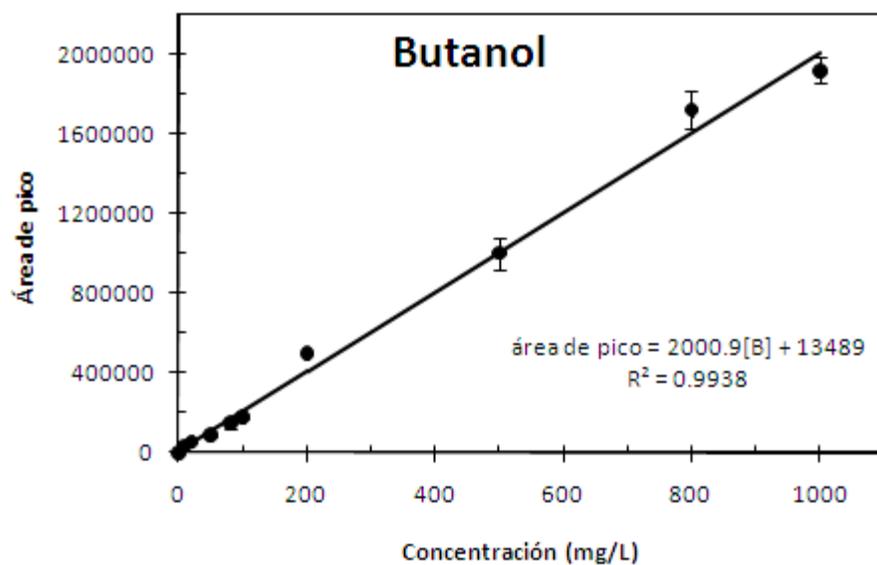
74. Setti, L., Lanzarini, G., Pifferi., P. G. y Spagna, G. 1993. Further research into aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp. *Chemosphere* 26(6): 1151-1157.
75. Stetter K., Huber R., Blöchl E., Kurr M., Eden R., Fielder M., Cash H. and Vance I. 1993. *Hyperthermophilic archaea* are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature* 365, 743–745.
76. Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T. and Harayama S. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Eviron. Sci. Technol.* 31:45-51
77. Tango M. and Islam M. 2002. Potential of Extremophiles for Biotechnological and Petroleum Applications.
78. Takahata Y., Nishijima M., Hoaki T. and Maruyama T. 2001. *Thermotoga petrophila* sp. nov. And *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51, 1901-1909.
79. Takahata Y., Nishijima M., Hoaki T. and Maruyama T. 2000. Distribution and physiological characteristics of hyperthermophiles in the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 73–79.
80. Tissot B. y Welte D. 1982. El petróleo su formación y localización: nuevas investigaciones para explotación de gas y petróleo. CONACyT, México.
81. Tomalá., Vera M. y Armas D. 2008. Otras formas de producción. Producción III. (<http://www.slideshare.net/diegoarmassalguero/produccion-3-otras-formas-de-extraccion-del-crudo-presentation>)
82. Tsai C-H., García J-L., Patel B., Cayol J-L., Baresi L. and Mah Robert. 1995. *Haloanaerobium alcaliphilum* sp. nov., an Anaerobic Moderate Halophile from the Sediments of Great Salt Lake, Utah. *International journal of systematic bacteriology.* 45, 301-307
83. Van Hamme J., Singh A. and Ward O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4): 503–49.
84. Ventosa A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria. F. Rodriguez-Valera (ed), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton CRC Press, USA, 71-84.
85. Wallnöfer P., Hutzinger O. and Engelhard G. 1984. Handbook of Microbiology, Laskin, A. J., Vol. VI, CRC Press, Cleveland.
86. Youssef N., Elshahed M. and McInerney. 2009. Microbial processes in oil fields: Culprits, problems and opportunities. *Advances in applied microbiology*, 66, 141-251.

87. Zhaodong N. and Zhicheng T. 2002. Thermokinetic investigation of effect of temperature on optimum NaCl concentration for petroleum bacterial growth. *Thermochimica acta*. 386, 17-22.
88. Zheng C., He J., Wang Y., Wang M. and Huang Z. 2011. Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic pallidus strains. *Bioresource Technology* 102, 9155–9161.
89. Zhengguo H., Yuehui S., Xiang T., Xue F., Mei B. et al. 2000. [MEOR pilot sees encouraging results in Chinese oil field](#). *Oil & Gas Journal* 98 (4): 46 – 52.
90. Zobell CE. 1947. Bacterial release of oil from sedimentary materials. *Oil Gas Journal* 2, 62–5.

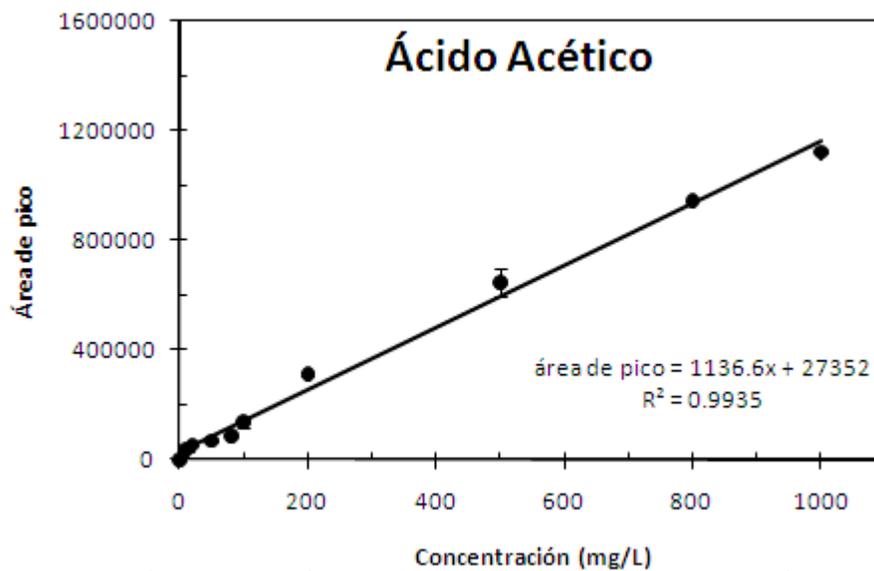
10. ANEXOS

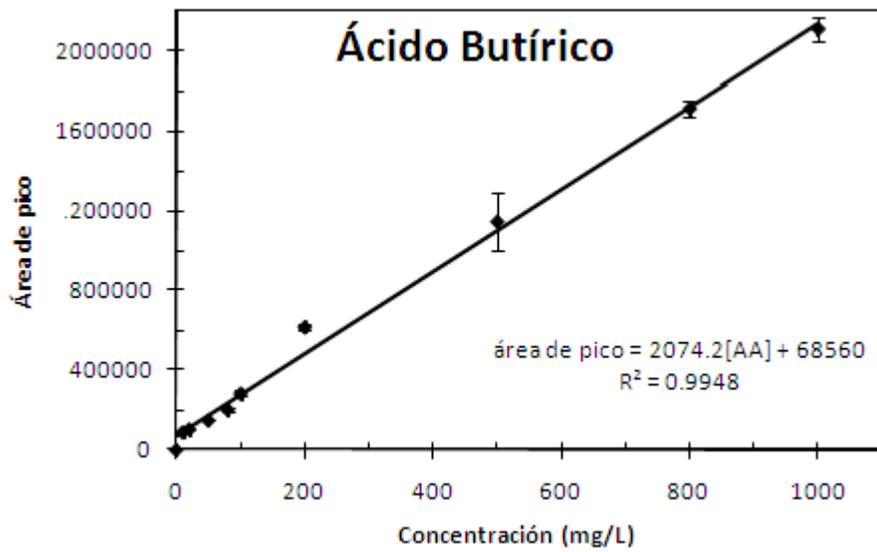
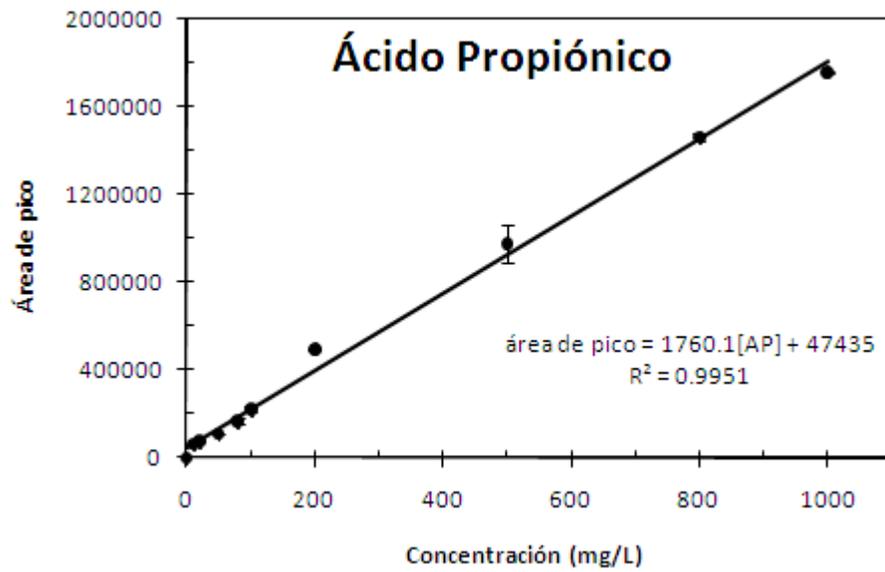
1. Curvas patrón de solventes



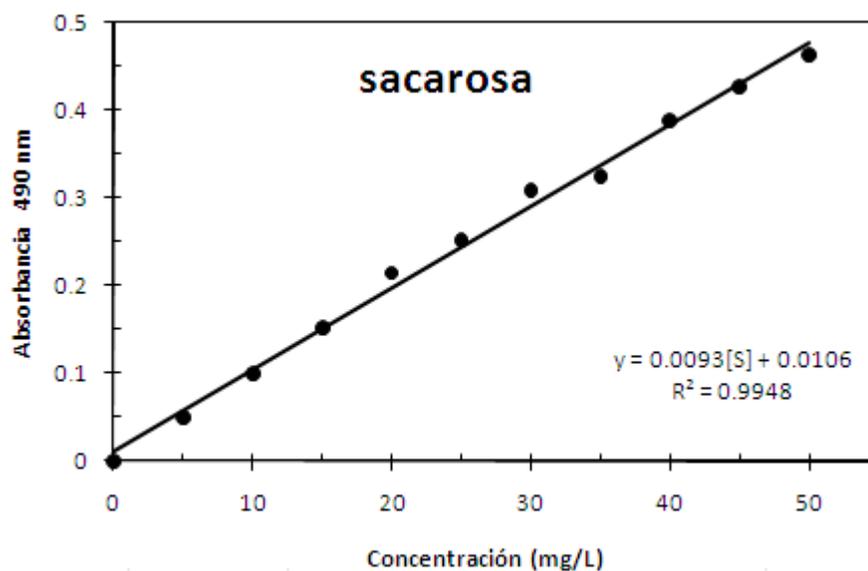


2. Curvas patrón de ácidos.

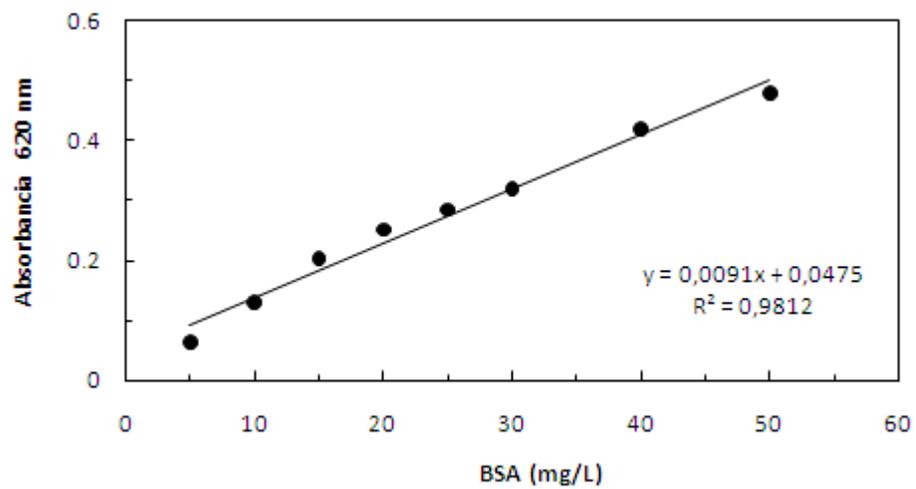




3. Curva patrón de sacarosa.



4. Curva patrón de proteína.



4.1 Curva patrón de proteína contra absorbancia

