

Capítulo 8 Degradación de hidrocarburos alifáticos de petróleo crudo en medio mineral utilizando un consorcio bacteriano

Chapter 8 Degradation of aliphatic hydrocarbons from crude oil in mineral medium using a bacterial consortium

RAMIREZ-ELIAS, Miguel*, BENITEZ-PINEDA, Paulo, ANGUEBES-FRANSESCHI, Francisco y MONTALVO-ROMERO, Carlos

Universidad Autónoma del Carmen, Facultad de Química, Calle 56 No. 4 Esq. Concordia, Col. Benito Juárez, Campus Principal. C.P. 24180, Cd del Carmen, Campeche, México.

ID 1^{er} Autor: *Miguel Ángel, Ramírez-Elías* / **ORC ID:** 0000-0002-3962-1117, **CVU CONACYT ID:** 256557

ID 1^{er} Coautor: *Paulo Alberto, Benítez-Pineda* / **ORC ID:** 0000-0002-4340, **CVU CONACYT ID:** 920418

ID 2^{do} Coautor: *Francisco, Anguebes-Franceschi* / **ORC ID:** 0000-0002-8190-2211, **CVU CONACYT ID:** 217824

ID 3^{er} Coautor: *Carlos, Montalvo-Romero* / **ORC ID:** 0000-0002-6761-3261, **CVU CONACYT ID:** 339918

DOI: 10.35429/H.2022.10.70.80

M. Ramirez, P. Benítez, F. Anguebes y C. Montalvo.

* mramirez.unacar@gmail.com

O. Benavides & A. Flores (VV. AA.). Ingeniería y Materiales Aplicados al Medio Ambiente. Handbooks- TII- ©ECORFAN-Mexico, 2022.

Resumen

En el presente estudio se utilizaron las bacterias: *Serratia marcescens* y *Microbacterium nematophilum* en forma de consorcio bacteriano, que se inoculó en un medio mineral, utilizando petróleo crudo medio (22,4 °API) al 1% en volumen como única fuente de carbono. Se realizaron medidas de Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) a diferentes intervalos de tiempo de contacto (7, 14 y 21 días) para identificar los grupos de hidrocarburos degradados, siendo éstos en mayor proporción los de la región de hidrocarburos alifáticos frente a los aromáticos. Por otro lado, 21 días después de la prueba de degradación del crudo, se confirmó por cromatografía de gases (GC-FID) que el consorcio bacteriano degradó los hidrocarburos alifáticos de C15 a C36. Los mayores porcentajes de degradación de alifáticos (n-alcenos) fueron C32 y C36 con un 100% y los menores porcentajes de degradación fueron alcanos isoprenoides; Pristano y Fitano con un 10% y 4%, respectivamente. Finalmente, el consorcio bacteriano formado por *S. marcescens* y *M. nematophilum* representa una buena alternativa para la biodegradación de hidrocarburos alifáticos (n-alcenos) presentes en crudo medio, representativo de la mezcla mexicana que se explota y produce en la Sonda de Campeche, México.

Biodegradación, Hidrocarburos alifáticos, Petróleo crudo, Espectroscopia, Cromatografía

Abstract

In the present study, the bacteria were used: *Serratia marcescens* and *Microbacterium nematophilum* in the form of a bacterial consortium, which was inoculated in a mineral medium, using medium crude oil (22.4 °API) at 1% by volume as the only carbon source. Infrared Spectroscopy (FT-IR) measurements were made at different contact time intervals (7, 14 and 21 days) to identify the groups of degraded hydrocarbons, these being in greater proportion those of the aliphatic hydrocarbon region compared to the aromatics. On the other hand, 21 days after the crude oil degradation test, it was confirmed by gas chromatography (GC-FID) that the bacterial consortium degraded the aliphatic hydrocarbons from C15 to C36. The highest percentage of aliphatic degradation (n-alkanes) were C32 and C36 with 100% and the lowest percentages of degradation were isoprenoid alkanes; Pristano and Fitano with 10% and 4%, respectively. Finally, the bacterial consortium made up of *S. marcescens* and *M. nematophilum* represents a good alternative for the biodegradation of aliphatic hydrocarbons (n-alkanes) present in medium crude oil, which is representative of the Mexican mixture that is exploited and produced in the Sound of Campeche, México.

Biodegradation, Aliphatic hydrocarbons, Crude oil, Spectroscopy, Chromatography

1. Introducción

La Sonda de Campeche, representa la mayor fuente de recursos económicos para México. En esta región del suroeste, se genera la mayor explotación y producción de petróleo crudo y gas, pero también es la que más derrames de petróleo ha presentado (55.86 mlbs) en un periodo comprendido de 2006 al 2013 (PEMEX 2014).

Por ello, la Sonda de Campeche y la Laguna de Términos en particular están expuestas y en condición de riesgo ante cualquier contingencia que se pueda presentar por derrames o accidentes originados en instalaciones petroleras durante las actividades de explotación, producción, comercialización o distribución de petróleo y sus derivados (PEMEX 2002).

Por otra parte, el petróleo puede ingresar al ambiente de manera natural a través de afloramientos naturales, mejor conocidos como chapopoteras o por derrames y accidentes ocasionados por el hombre, lo cual es tal vez, una de las causas más frecuentes, junto con los fondos de tanque (Gonzales & Pucci, 2022). En el Golfo de México y Sonda de Campeche se derramaron 560 millones de litros de crudo, por el pozo exploratorio IXTOC I en el año de 1979, contaminando las costas de Campeche, Veracruz y otros estados; actualmente y a pesar de que han transcurrido más de 40 años del accidente del pozo IXTOC I, se han encontrado restos del petróleo derramado en las costas de Campeche (Atlas 1981; Botello et al. 1996; Alpuche-Gual & Gold-Bouchot, 2014).

Durante el derrame de 636 millones de litros ocurrido en el 2010 en las aguas profundas del norte del Golfo de México por la plataforma Deepwater Horizon, se aplicaron alrededor de 6.6 millones de litros de dispersantes químicos para mitigar la contaminación del petróleo. No obstante, debido a que estos compuestos están formulados con detergentes como es el propanol, el cual incrementa la toxicidad del petróleo en los organismos marinos; además tener un efecto letal en las comunidades microbianas (Mascarelli, 2010).

Los riesgos asociados con las actividades desarrolladas por la industria petrolera adquieren atención especial, ya que el petróleo y sus derivados representan una amenaza para la flora y fauna, así como a la salud humana; debido a la naturaleza carcinogénica y recalitrante de hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en el mismo, los cuales son bioacumulables (Hidayat & Tachibana, 2012). Por tanto, es necesario el desarrollo de alternativas de control de bajo costo y más eficaces que contribuyan a reducir el impacto negativo al ambiente, y con mayor potencial para la degradación de petróleo crudo (Xuliang Zhuang et al., 2022; Novoa García, 2022).

La biorremediación de petróleo mediante consorcios bacterianos es considerada una técnica económica y eficaz comparada con las técnicas físicas y químicas actuales (Salleh et al., 2003; Das & Chandran, 2011).

Ramirez-Elías y colaboradores (2014) reportaron que *Serratia marcescens* y *Microbacterium nematophilum* son bacterias degradadoras de petróleo y que ambas se encontraron presentes en la rizósfera de manglares; así mismo, reportaron que *S. marcescens* es una bacteria Gram negativa presente en ambientes costeros y pertenece al phylum Proteobacterias, mientras que la bacteria *M. nematophilum* pertenece al phylum Actinobacteria. Por ello, el consorcio bacteriano aplicado en el presente estudio representa una alternativa importante para mejorar la biorremediación de petróleo crudo.

Con el desarrollo del presente trabajo se generará información importante respecto a una alternativa para biodegradar hidrocarburos alifáticos de petróleo crudo (22.4 °API), representativo de la mezcla mexicana que se produce en la Sonda de Campeche, México. Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue determinar el porcentaje de degradación de hidrocarburos alifáticos (*n*-alcanos) de petróleo crudo medio utilizando un consorcio bacteriano conformado por las bacterias: *Serratia marcescens* y *Microbacterium nematophilum*.

2. Descripción del método

2.1 Crecimiento bacteriano durante los ensayos de biodegradación de petróleo crudo

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas de un cepario de bacterias aisladas de la rizósfera de manglares de la Laguna de Términos (Ramírez-Elías, 2015). Se seleccionaron y utilizaron las cepas con mayor capacidad de tolerar y crecer en petróleo crudo como es el caso de *Serratia marcescens* (No. de acceso en Genbank: KF921611) y *Microbacterium Nematophilum* (No. de acceso en Genbank: KF921619). Se reactivaron y/o resembraron cada una de ellas por separado en cajas Petri con Agar Nutritivo (Merck®) para su posterior uso, en ensayos de degradación de hidrocarburos de petróleo crudo. El consorcio bacteriano se conformó con la combinación de dichas cepas bacterianas (*S. marcescens* y *M. nematophilum*).

Se preparó el medio mineral (MM) a partir de una solución con 0.4 g K_2HPO_4 , 0.1 g KH_2PO_4 , 0.05 g NaCl, 0.014 g NaF_2 EDTA, 0.0125 g Na_2MoO_4 y 450 mL de agua destilada (solución A); y una solución con 0.1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.03 g $CaCl_2$ y 50 mL de agua destilada (solución B). Se ajustó el pH a 7 y se esterilizaron por separado las soluciones A y B durante 15 min a $15 \text{ lb} \cdot \text{plg}^{-2}$. Se enfriaron y ambas soluciones se homogenizaron en condiciones estériles. Se preparó la solución bacteriana (SB) tomando una azada de cada bacteria seleccionada y se disolvió en un tubo de dilución con agua destilada estéril, de la cual se tomaron 3 mL del consorcio bacteriano para inocularlos en cada unidad experimental (UE) y realizar las pruebas de degradación de petróleo crudo (Ramírez-Elías et al., 2014). Las UE se prepararon colocando 500 μL de petróleo crudo (22.4 °API), 50 mL de MM y 3 mL de SB en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, las UE por triplicado se incubaron durante los respectivos periodos de tiempo siguientes: 7, 14 y 21 días, a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ y 180 rpm en un agitador (modelo CVP-2000P). Transcurrido el tiempo de los ensayos, se realizó la cuantificación de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ promedio del consorcio bacteriano, utilizando la técnica de dilución seriada y rastrilleo en placa.

2.2 Método de extracción y purificación de hidrocarburos

Se empleó una extracción líquido-líquido utilizando diclorometano grado cromatográfico como disolvente principal (Carmo et al., 2011). Después de cada ensayo de biodegradación; la muestra se depositó en embudo de separación, se le agregaron 50 mL de diclorometano, se agitó durante tres minutos, y se dejó reposar 10 min. Transcurrido el tiempo de reposo, el extracto orgánico se recuperó en matraz balón de fondo plano y se reconcentró el extracto mediante baño maría, hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. La fase orgánica se purificó en un embudo de separación empacado con lana de vidrio agregando 4 g de sulfato de sodio anhidrido, 4 g de gel de sílice y 4 g de sulfato de sodio anhidrido. Los extractos puros, se reconcentraron en un rotavapor (Hahnshin Scientific Co. Modelo: HS-2001NS), hasta un volumen aproximado de 2 mL y se depositaron en viales color ámbar para su conservación y posterior cuantificación por espectroscopia (FT-IR) y cromatografía de gases (GC-FID).

2.3 Análisis mediante espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)

Se analizaron las muestras de petróleo crudo (22.4 °API) mediante un espectrómetro con infrarrojo medio, modelo Cary 600, Marca Agilent Technology, equipado con un ATR con punta de diamante de reflexión atenuada total, modelo Gladi de Pike Technologies. Para el análisis del petróleo crudo y de las muestras de crudo parcialmente degradadas, se colocaron 0.3 mL de alícuota sobre la superficie del diamante del ATR a una temperatura controlada de 24 ± 1 °C; se obtuvieron los espectros realizando ocho escaneos a una resolución de 2 cm^{-1} en un rango entre $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$; después de cada medición, se limpió la superficie del cristal del ATR con acetona y papel absorbente. Los datos de los espectros se exportaron a Excel V. 13 de Microsoft para su análisis.

2.4 Porcentaje de biodegradación de hidrocarburos alifáticos (n-alcenos) de petróleo crudo mediante Cromatografía de Gases (GC-FID)

El porcentaje de hidrocarburos alifáticos residuales a los 21 días del ensayo se determinó mediante un cromatógrafo de gases con las siguientes especificaciones técnicas: modelo 6890N (Net Work GC system), marca Agilent Technologies, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna DB5, 5%-fenil- metilpolisiloxano de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y $0.25 \mu\text{m}$ de espesor de película. La temperatura de inicio fue de 50°C durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280°C usando una rampa de calentamiento de $20^\circ\text{C min}^{-1}$, utilizando Helio como gas acarreador con un flujo de 1 mLmin^{-1} . La temperatura del inyector fue de 250°C , con inyección Split y una relación de Split de 50:1. Se utilizó como estándar de calibración una mezcla de alcanos (100 mg/L en CH_2Cl_2 , C8 – C40) marca Supelco.

Para conocer las concentraciones residuales de los hidrocarburos alifáticos, se determinaron los tiempos de retención y las áreas bajo la curva de las muestras degradadas y del estándar aplicado. Con las áreas bajo las curvas, generadas en el Cromatógrafo de Gases, se programaron y calcularon los porcentajes de degradación de hidrocarburos alifáticos, utilizando una hoja de Excel 2017 de Microsoft-Windows, aplicando la ecuación 1.

$$\% \text{ Degradación} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100 \quad (1)$$

Donde:

A_0 : Es el área total del testigo en el cromatograma a un tiempo $t = 0$ (Hidrocarburo sin degradar).

A_t : Es el área total de petróleo degradado en un tiempo t (Hidrocarburo degradado).

2.5 Análisis estadístico

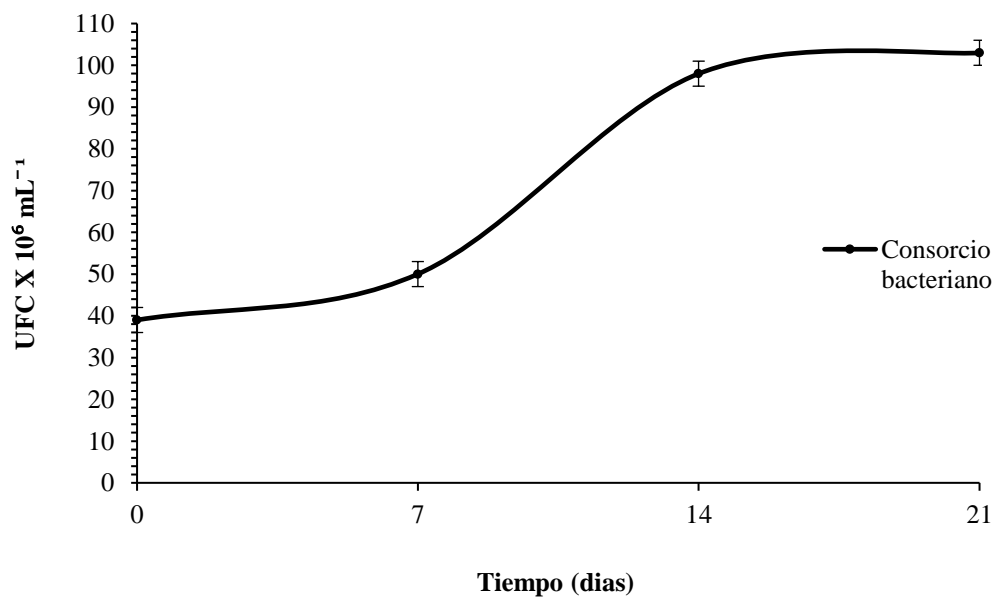
Se calcularon la media y el error estándar de tres réplicas. Los valores medios de UFC del consorcio bacteriano y los porcentajes de degradación se compararon mediante un análisis de ANOVA con un nivel de significancia del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2017).

3. Resultados

3.1 Crecimiento del consorcio bacteriano durante la degradación de hidrocarburos alifáticos (*n*-alcanos) de petróleo crudo medio.

El gráfico 1, muestra la curva de crecimiento del consorcio bacteriano, se puede observar en primera instancia que el periodo de latencia en el día siete alcanza apenas 50×10^6 UFC mL⁻¹, lo anterior es debido a su exposición inicial a las altas concentraciones de hidrocarburos de petróleo crudo formados por compuestos lipofílicos, los cuales inhiben el desarrollo microbiano produciendo intoxicación (LaGrega et al., 1996) e inducen en las bacterias una respuesta de “stress” y cambios celulares a nivel de la membrana, enzimas y proteínas (Sikkema et al., 1995). Durante esta fase, se presenta el fenómeno de lisis, según en el cual los nutrientes que quedan en las células muertas se difunden en el medio, proporcionando alimento a las células vivas existentes (García, 2012). Entre 7 y 14 días, se observa un crecimiento más significativo, alcanzando un valor de 98×10^6 UFC mL⁻¹ en el día 14, mientras en el periodo de 14 a 21 días, se tiene un crecimiento mínimo, con un valor máximo de 103×10^6 UFC mL⁻¹ en el día 21.

Gráfico 1 Curva de crecimiento del consorcio bacteriano (*S. marcescens* y *M. nematophilum*) durante el ensayo de degradación de hidrocarburos de petróleo crudo medio

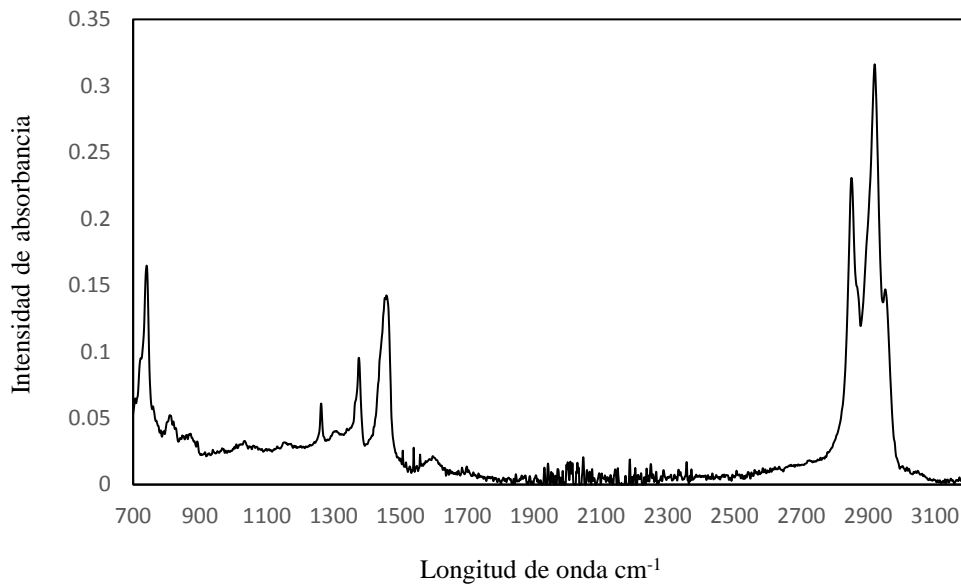


Fuente: Elaboración Propia

3.2 Caracterización de la degradación de hidrocarburos de petróleo crudo por espectroscopia de infrarrojo (FT- IR)

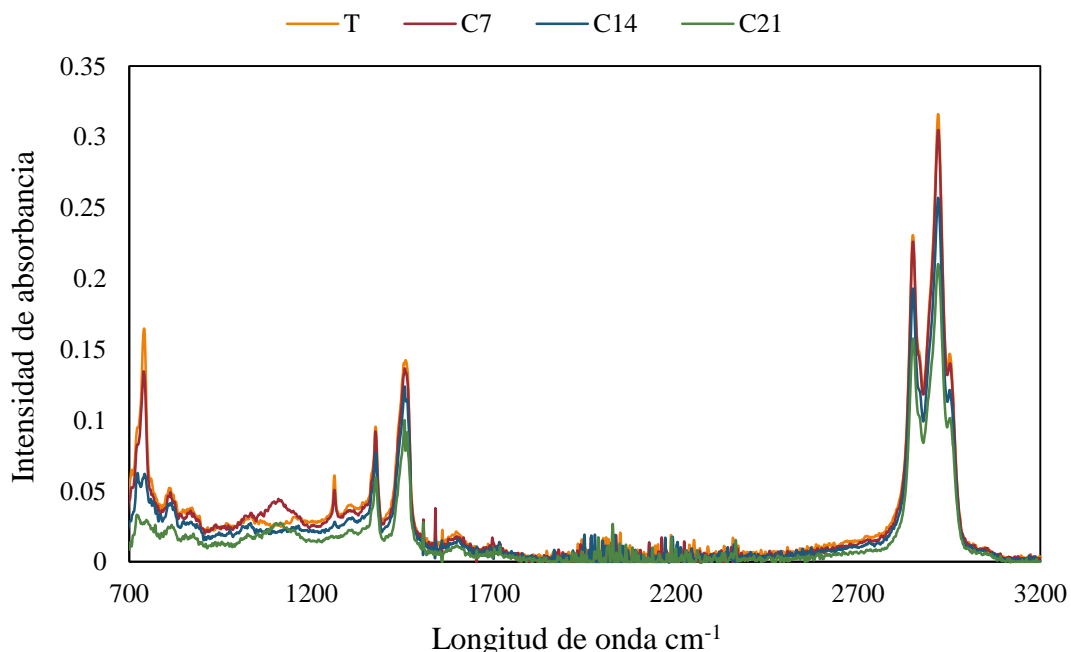
Mediante espectroscopia de infrarrojo, se caracterizó el petróleo (22.4 °API) antes y durante el periodo del proceso de degradación de hidrocarburos (entre 0-21 días) en medio mineral con el fin de estudiar los cambios en su estructura química. El espectro de infrarrojo (**Gráfico 2**) muestra que el crudo sin degradar (testigo) presenta varias bandas de absorbancias. En esta figura, el pico de absorbancia en 2953 cm⁻¹, la banda de absorbancia entre 1650 - 1600 cm⁻¹ y los picos de absorbancia entre 874 - 710 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de estiramiento fuera del plano de enlaces C-H y C=C presentes en hidrocarburos alifáticos y en compuestos aromáticos complejos como asfaltenos y resinas (Castro & Vázquez, 2009).

Se presentaron cuatro picos de absorbancia intensos a 2918 y 2852 cm⁻¹, 1460 cm⁻¹ y 1376 cm⁻¹ los cuales están relacionados con vibraciones de estiramiento simétrico y de flexión asimétrico de los grupos funcionales -CH₂- y -CH₃ (González et al., 2006; Meléndez et al., 2012). La banda de absorbancia de baja frecuencia entre 1650 - 1600 cm⁻¹ se atribuyen a vibraciones de estiramiento de enlaces conjugados C=C presentes en los hidrocarburos alifáticos, y a enlaces C=C presentes en compuestos aromáticos (Gabrienko et al., 2014).

Gráfico 2 Espectro de infrarrojo de petróleo crudo medio sin degradar usado como testigo (T)

Fuente: Elaboración Propia

Las huellas espectrales de infrarrojo (Gráfico 3), muestran que el consorcio bacteriano presenta capacidad para degradar hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en el crudo. Los picos de absorbancia a 2918, 2852, 1460 y 1376 cm^{-1} disminuyen progresivamente durante el proceso de degradación para 7, 14 y 21 días. Lo que indica que el crudo presenta cambios en su estructura molecular debido al rompimiento de los enlaces $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$ presentes en los hidrocarburos alifáticos. Asimismo, la disminución de los picos de absorbancia a 2953 cm^{-1} , junto con la banda de absorbancia entre 1650-1600 cm^{-1} y los picos de absorbancia entre 874-710 cm^{-1} muestran también rompimientos de los enlaces insaturados cis y trans ($\text{C}=\text{C}$) presentes en los hidrocarburos alifáticos y en los anillos aromáticos, así como rompimientos de enlaces carbono-hidrogeno C-H presentes en los compuestos poliaromáticos. También se puede apreciar en las Figuras 3, el efecto que tiene el consorcio bacteriano en la degradación del crudo en las variaciones de las bandas de absorbancia en el espectro de infrarrojo medio. Cabe señalar que la disminución en la intensidad de las bandas detectadas por espectrometría infrarroja (Absorbancia) se tomó como un indicador en la biodegradación de hidrocarburos de petróleo crudo medio, realizada por el consorcio bacteriano.

Gráfico 3. Huellas espectrales de infrarrojo de petróleo crudo medio (T), durante 7, 14 y 21 días

Fuente: Elaboración Propia

3.3. Porcentaje de biodegradación de hidrocarburos alifáticos (n-alcenos) de petróleo crudo mediante Cromatografía de Gases

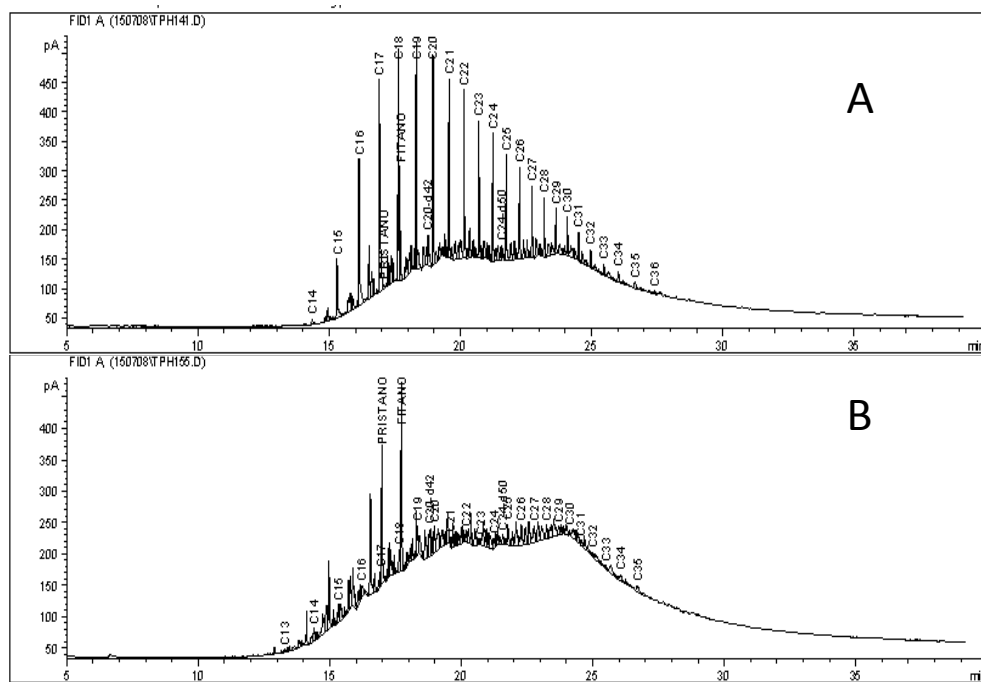
Por medio de cromatografía de gases (GC-FID), se determinó con mayor precisión el porcentaje de degradación de hidrocarburos alifáticos (C₁₅ al C₃₆) por parte del consorcio bacteriano aplicado, a los 21 días del ensayo; confirmando con ello, el porcentaje de degradación significativo observado con espectroscopia de infrarrojo (FT-IR).

En el gráfico 4, se muestran y comparan los cromatogramas del testigo y consorcio bacteriano a 21 días del ensayo de degradación de hidrocarburos de petróleo crudo medio. Cabe señalar que en este periodo de tiempo se mostró mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos alifáticos, lo cual coincide con la caracterización realizada mediante espectroscopia de infrarrojo. Se puede observar una disminución importante de hidrocarburos alifáticos (*n*-alcenos cadena larga) desde el C₁₅ al C₃₆ con excepción de los alcanos isoprenoides; Pristano y el Fitano, por acción del consorcio bacteriano en comparación con el testigo. El porcentaje de degradación promedio de los *n*-alcenos obtenidos con el consorcio bacteriano, fueron del 88% para C₁₇, C₁₈ y C₁₉, 95% para el C₂₀ al C₃₁ y C₃₄, 96% para C₃₅, 98% para C₃₃ y 100% para el C₃₂ y C₃₆, respectivamente. Los compuestos menores al carbono C₁₄ no fueron detectados en los diversos tratamientos; lo cual, se justifica dado que diferentes autores han señalado que los alifáticos de cadena corta, se volatilizan en las primeras horas después de un derrame o por su propia naturaleza como compuestos orgánicos volátiles (Cookson, 1995).

En el Gráfico 5, se presenta el porcentaje de la remoción de hidrocarburos alifáticos desde el C₁₅ al C₃₆, mostrando altos porcentajes de degradación del consorcio bacteriano a 21 días; donde los porcentajes de degradación mayores al 88 % se presentan desde el C₁₇ al C₃₆.

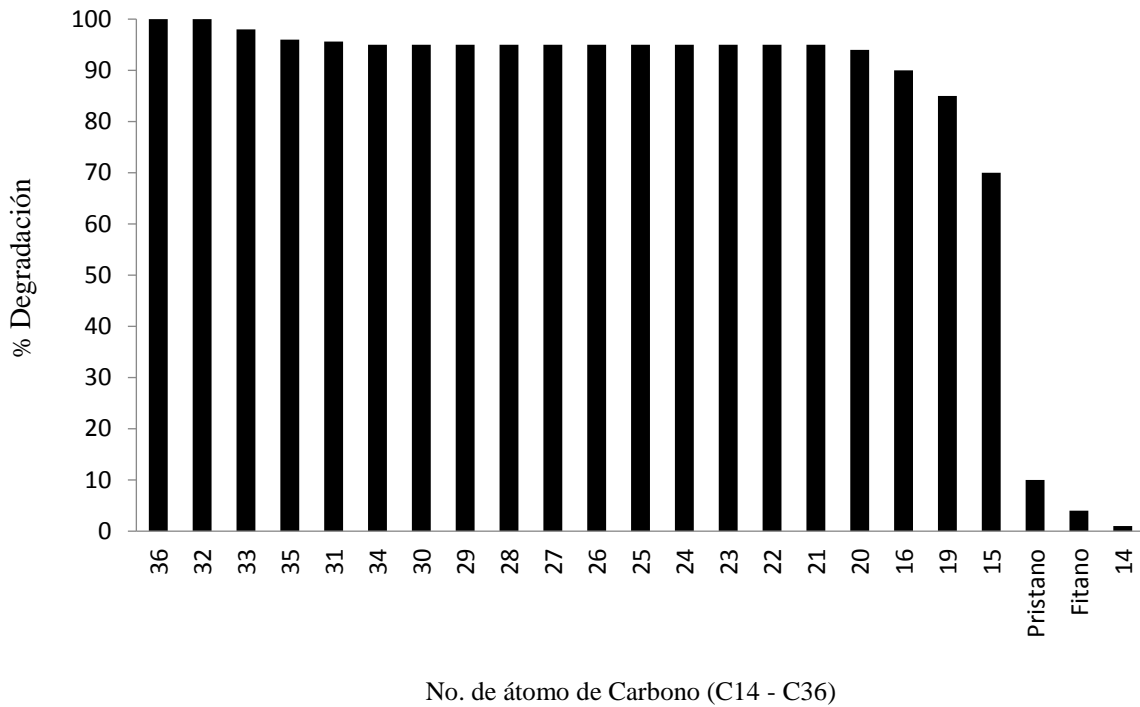
El mayor porcentaje de degradación de alifáticos logrado por el consorcio bacteriano a 21 días, se presentó en el C₃₂ y C₃₆ con el 100% y el menor porcentaje de degradación se presentó en el Pristano y Fitano con 10% y 4% respectivamente.

Gráfico 4 Cromatogramas del ensayo de degradación de hidrocarburos alifáticos (C₁₄ al C₃₆) de petróleo crudo medio a 21 días: A) Testigo. B) Consorcio bacteriano



Fuente: Elaboración Propia

Gráfico 5 Porcentaje de biodegradación de hidrocarburos alifáticos (C₁₄ al C₃₆) de petróleo crudo medio a 21 días



No. de átomo de Carbono (C14 - C36)

Fuente: *Elaboración Propia*

4. Agradecimiento

Paulo. A. Benítez Pineda, agradece al Laboratorio de Ing. Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Carmen, el apoyo brindado durante la presente investigación. así como al PNPC_CONACYT por la beca recibida durante los estudios de Maestría en Ciencias Ambientales (3a Generación: 2018-2020, CVU-920418).

5. Conclusiones

La espectroscopia de infrarrojo medio (FT-IR) generó información confiable que permite determinar cualitativamente la degradación de hidrocarburos presentes en petróleo crudo.

Mediante la cromatografía de gases (GC-FID), se confirmó que el consorcio bacteriano a 21 días, degradó hidrocarburos desde el C₁₅ al C₃₆, y de forma específica; los porcentajes de degradación de *n*-alcanos más altos fueron el C₃₂ y C₃₆ con el 100% y los menores porcentajes de degradación lo presentaron el Prístano y Fitano, con 10% y 4%, respectivamente.

El consorcio bacteriano conformado por *S. marcescens* y *M. nematophilum*, representa una alternativa importante para degradar hidrocarburos alifáticos (*n*-alcanos); así como, para atender problemas de contaminación con petróleo crudo medio en la Sonda de Campeche y/o región del Golfo de México.

6. Referencias

- Alpuche-Gual, L. & Gold-Bouchot, G. (2014). Hidrocarburos totales en sedimentos cercanos a plataformas de exploración y de extracción de petróleo en la sonda de Campeche, p. 383-398. En: A.V. Botello, J. Rendón von Osten, J. A. Benítez y G. Gold-Bouchot (eds.). Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. uac, unam icmyl, cinvestav-Unidad Mérida. 1176 p. ISBN 978-607-7887.
https://r.search.yahoo.com/_ylt=AwrFFBEoupJjvaEC7DLD8Qt.;_ylu=Y29sbwNiZjEEcG9zAzQEdnRpZAMEc2VjA3Ny/RV=2/RE=1670589096/RO=10/RU=http%3a%2f%2fepomex.uacam.mx%2f%3fmodulo_micrositio%3dpaginas%26acciones_micrositio%3ddescargar%26archivo%3dmodulos%2fpaginas%2farchivos%2f14%2fadjuntos%2fGM3TomoII.pdf%26vistafull_micrositio%3dyes/RK=2/RS=r4ejj.W6q9pz_VhX63vbgGcprOs-
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Review* 45, 180-209. <https://www.semanticscholar.org/paper/Microbial-degradation-of-petroleum-hydrocarbons%3A-an-Atlas/dfd6b6e9414f9f8793c2282922ba0646e8169b99>
<https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/mr.45.1.180-209.1981>
- Botello, A.V., Ponce-Velez, G. & Macko, S. (1996). Niveles de concentración de hidrocarburos en el Golfo de México, p. 225-253. En: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez y D. Zárata-Lomelí (Eds.) Golfo de México, Contaminación en Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México, 666 p.
https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Botello%2C+A.V.%2C+Ponce-Velez%2C+G.+y+Macko%2C+S.+%281996%29.+Niveles+de+concentraci%C3%B3n+de+hidrocarburos+en+el+Golfo+de+M%C3%A9xico%2C+p.+225-253.+En%3A+A.V.+Botello%2C+J.L.+Rojas-Galaviz%2C+J.A.+Ben%C3%ADtez+y+D.+Z%C3%A1rate-Lomel%C3%AD+%28Eds.%29+Golfo+de+M%C3%A9xico%2C+Contaminaci%C3%B3n+en+Impacto+Ambiental%3A+Diagn%C3%B3stico+y+Tendencias.+EPOMEX+Serie+Cient%C3%ADfica+5.+Universidad+Aut%C3%B3noma+de+Campeche%2C+M%C3%A9xico%2C+666+p.&btnG=
<https://doi.org/10.3109/10408417709102810>
- Castro, L. V. & Vázquez, F. (2009). Fractionation and characterization of Mexican crude oils. *Energy & Fuel* 23, 1603-1609.
https://www.researchgate.net/publication/231273886_Fractionation_and_Characterization_of_Mexican_Crude_Oils <https://doi.org/10.1021/ef8008508>
- Carmo, F.L., Fragoso dos santos, H., Ferreira Martins, E., Van Elsas J.D., Soares Rosado, A. & Silva Peixoto, R. (2011). Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plant. *J. Microbiol.* 49,535-543
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-011-0528-0> <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0528-0>
- Cookson, J. Jr. (1995). *Bioremediation Engineering: Design and Application*. Mc Graw Hill, New York.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Bioremediation-engineering-%3A-design-and-application-Cookson/20c5f42f8753609c27780821218e3c746b685863> <https://doi.org/10.5860/choice.33-0950>
- Das, N. & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnol Reserch Internal* 13. <https://www.hindawi.com/journals/btri/2011/941810/>
<https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M. & Robledo C.W. (2017). Software estadístico InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
<http://www.infostat.com.ar>
- Gabrienko, A. A., Lai, C. H. & Kazarian, S. G. (2014). In situ chemical imaging of asphaltene precipitation from crude oil induced by *n*-heptane. *Energy & Fuel* 28, 964-971.
<https://www.semanticscholar.org/paper/In-Situ-Chemical-Imaging-of-Asphaltene-from-Crude-Gabrienko-Lai/9421d62cc9187ef4dd6fc36d61d5770d1c931ed1> <https://doi.org/10.1021/EF402255C>

- García Flores E. R. (2012). Tratamiento por bioaumentación de un agua contaminada con hidrocarburos colectada en un terreno en rehabilitación. Maestría en Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. 165 p https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000681163
<http://132.248.9.195/ptd2012/junio/0681163/Index.html>
- González, G., Sousa M. A. & Lucas, F. E. (2006). Asphaltene precipitation from crude oil and hydrocarbon media. *Energy & Fuel* 20, 2544-2551.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Asphaltene-Precipitation-from-Crude-Oil-and-Media-Gonz%C3%A1lez-Sousa/6f75ce0caf31ed0277a53ff19863a3f98bd7f7b1>
<https://doi.org/10.1021/EF060220J>
- González, M., & Pucci, G. (2022). Aislamiento de bacterias post tratamiento con gasoil-agua y centrifugación de fondo de tanques petroleros. *Revista peruana de biología*, 29(2).
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/21526>
<https://doi.org/10.15381/rpb.v29i2.21526>
- Hidayat, A. & Tachibana, S. (2012). Biodegradation of Aliphatic Hydrocarbon in Three Types of Crude Oil by *Fusarium* sp. F092 under Stress with Artificial Sea Water. *Journal of Environmental Science and Technology* 5, 64-73. <https://scialert.net/abstract/?doi=jest.2012.64.73>
<https://dx.doi.org/10.3923/jest.2012.64.73>
- Lagrega, M., Buckingham, P. & Evans, J. (1996). Gestión de Residuos Tóxicos – tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Madrid, España: Mc-Graw Hill/Interamericana de España S. A. <https://www.semanticscholar.org/paper/Gesti%C3%B3n-de-residuos-t%C3%B3xicos%3A-tratamiento%2C-y-de-LaGrega-Buckingham/6e81df335d46661f454f4ae7984a61a6a33ad9ec>
- Mascarelli, A. (2010). Debate grows over impact of dispersed oil. *Nature News*. <https://www.nature.com/articles/news.2010.347#citeas> <https://doi.org/10.1038/news.2010.347>
- Meléndez, L. V., Lache, A., Orrego-Ruiz, J. A., Pachón, Z. & Mejía-Ospino, E. (2012). Prediction of the SARA analysis of Colombian crude oils using ATR-FTIR spectroscopy and chemometric methods. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 90, 56-60.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Prediction-of-the-SARA-analysis-of-Colombian-crude-Melendez-Lache/2c73541ef4b22b5b8e27e9f1dd30ae468e8b9933>
<https://doi.org/10.1016/J.PETROL.2012.04.016>
- Novoa García, M. F. (2022). Microorganismos como herramienta para minimizar el impacto ambiental por derrame de hidrocarburos. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/4717>
<https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/4717/1.%20Proyecto%20final%20-%20Novoa%20Mar%c3%ada%20PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- PEMEX (2002). Seguridad, Salud y Medio Ambiente. *Protección Ambiental*. 12-24.
<https://es.scribd.com/document/163432186/PEMEX-Informe-Seguridad-Salud-y-Medio-Ambiente-2002>
- PEMEX (2014). Elementos del plan de negocios de PEMEX y sus organismos subsidiarios 2014-2018. <https://vdocuments.net/plan-de-negocios-de-petroleos-mexicanos-y-sus-organismos-.html?page=22>
- Ramírez-Elías, M. A., Ferrera-Cerrato R., Alarcón, J. J., Almaraz, G., Ramírez Valverde, L. E., de-Bashan, F. J., Esparza-García, O., García-Barradas (2014). Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential, *Applied Soil Ecology*, 82, 1-10, ISSN 0929-1393.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139314001395>
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.001>

Ramirez-Elías, M. A. (2015). Degradación de hidrocarburos de petróleo mediante bacterias rizosféricas aisladas de manglares de la Laguna de Términos 115-125. En: Aguilar-Ucán, C.A., Anguebes-Franceschi, F., Carballo-Pat C.G., Cerón-Breton J.G., Cerón-Breton R.M., Montalvo-Romero C., Ramirez-Elias M.A. y Zavala-Loria J.C. (2015). AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA: medio ambiente, bioenergía y procesos. Universidad Autónoma del Carmen. LyM Editores. Primera edición. Campeche, Mexico.166 p. ISBN978-607-9709-70-9

Salleh, A.B., F.M. Ghazali, R.N.A. Rahman, & M. Basri. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology* 2, 411-425. <https://www.semanticscholar.org/paper/Bioremediation-of-Petroleum-Hydrocarbon-Pollution-Salleh-Ghazali/37ffdfb69b2c56c6429b9ffc6b817a89b9226942>
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/11330/1/IJBT%20\(3\)%20411-425.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/11330/1/IJBT%20(3)%20411-425.pdf)

Sikkema, J. Bont, J. A. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201-222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7603409/>
<https://doi.org/10.1128/mr.59.2.201-222.1995>

Xuliang Zhuang, Yaxin Wang, Haoyu Wang, Yuzhu Dong, Xianglong Li, Shijie Wang, Haonan Fan, Shanghua Wu. (2022). Comparison of the efficiency and microbial mechanisms of chemical and bio-surfactants in remediation of petroleum hydrocarbon, *Environmental Pollution*, Vol. 314. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749122014129?via%3Dihub>
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120198>