

# Remediación de fondos de tanque por utilización de microorganismos autóctonos

Acuña, Adrián\*, Cambarieri, Luciana, Pucci, Oscar <sup>(1)</sup>, Pucci, Graciela <sup>(1)</sup>

Grupo de Estudios Ambientales (GEA) Facultad Regional Santa Cruz, Universidad Tecnológica Nacional.

Los Inmigrantes 555, Río Gallegos (CP 9400), Santa Cruz. [adrianjacuna@yahoo.com.ar](mailto:adrianjacuna@yahoo.com.ar).

(1) Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia (9000) Chubut.

## RESUMEN.

Los fondos de tanque provenientes de la industria petrolera son un problema ambiental a resolver en la cuenca del Golfo San Jorge. En este trabajo se estudio la biodegradación del hidrocarburo remanente que queda en el sedimento después del lavado con agua y detergente del fondo de tanque. Para tal fin se realizaron biorreactores en los cuales, el proceso de biodegradación, se monitoreo por consumo de oxígeno, recuentos de bacterias aerobias totales y degradadoras de hidrocarburos y cuantificación de hidrocarburos por espectroscopia infrarroja (FTIR) y por cromatografía gaseosa (GC). El sedimento proveniente del lavado de fondo de tanque contenía cantidad suficiente de bacterias degradadoras de hidrocarburos y aerobias totales, con un predominio de los géneros *Pseudomonas* sp y *Rhodococcus* sp que junto a las condiciones de 20 % humedad, oxigenación y nutrientes en una proporción de 100:3:0,3 redujeron los hidrocarburos presentes de 2,9 a 0,4 %. La degradación se produjo mayoritariamente entre los hidrocarburos alifáticos de cadena entre 13 a 26 átomos de carbono, siendo la fracción aromática la que presentó la menor biodegradación.

**Palabras Claves:** Fondo de tanque, biodegradación, hidrocarburos.

## ABSTRACT.

Oil bottom tank sludge is an environmental problem to be solved in the Gulf San Jorge basin. In this paper we study the biodegradation of hydrocarbon remaining in the sediment after washing with water and detergent of the oil bottom tanks. Bioreactors were performed in which the biodegradation process was monitored by oxygen consumption, total aerobic bacteria counts and hydrocarbon degraders and quantification of hydrocarbons by infrared spectroscopy (FTIR) and by gas chromatography (GC). Oil bottom tank contained enough oil degrading bacteria and total aerobic, with a predominance of the genera *Pseudomonas* sp and *Rhodococcus* sp which together with the conditions of 20% humidity, oxygen and nutrients in a ratio of 100:3:0,3 reduced the hydrocarbons present from 2.9 to 0.4%. The degradation was mainly from aliphatic hydrocarbon chain from 13 to 26 carbon atoms, with the aromatic fraction which had the lowest biodegradation.

**Keywords:** Bottom tank, biodegradation, hydrocarbons.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El manejo inadecuado de los materiales y residuos ha generado en todo el mundo un problema de contaminación en suelos y cuerpos de agua. Entre las más severas contaminaciones se destacan las producidas a causa de la extracción y el manejo del petróleo en todos los países productores de hidrocarburos [1]. El tratamiento de residuos contaminados con hidrocarburos es esencial para mantener la calidad del medio ambiente y la salud de la población. La industria petrolera genera contaminantes sólidos, semisólidos y líquidos que requieren diferentes formas de tratamiento. Los tratamientos pueden ser físicos, químicos y biológicos dependiendo de la muestra y el estado de contaminación que posea. Los tratamientos biológicos son muy buenos pero necesitan condiciones de pH, humedad, nutrientes y concentraciones de hidrocarburos y metales pesados por debajo de 5% y 2500 ppm respectivamente [2].

Uno de los residuos generados por esta actividad en las plantas de tratamiento y almacenamiento son los llamados fondos de tanque. Se trata de un producto acumulado en el fondo de los tanques de almacenamiento de petróleo y otras instalaciones, formado por la precipitación de partículas sólidas y fracciones del petróleo. Los fondos de tanque de petróleo son periódicamente removidos ya que quitan espacio de almacenamiento. Estos suelen contener agua, sedimentos, arenas, grasas, aceites, petróleo, compuestos orgánicos y elementos inorgánicos. Existen varios métodos para limpiar los fondos de tanque, en algunas áreas se realiza un lavado del mismo con detergentes y agua caliente, quedando un residuo que contiene partículas finas de sedimento y un porcentaje variable de hidrocarburos, que muchas veces sigue siendo superior a lo que exige la legislación vigente.

Existe una gran variedad de tratamientos que pueden aplicarse a este tipo de residuos contaminados con hidrocarburos, que van desde solo disponerlos en lugares considerados seguros, métodos de incineración, tratamientos químicos y tratamientos biológicos. La biorremediación, un tratamiento biológico, es una de las herramientas más adecuadas para el saneamiento de estos residuos. Es una técnica de bajo costo de operación que ha sido aplicada exitosamente en este tipo de contaminaciones en suelos patagónicos [3, 4].

En la experiencia se ha podido observar que existen diversos parámetros que pueden aumentar la eficiencia de estos tratamientos, como el agregado de nutrientes e inoculación de bacterias seleccionadas obtenidas del mismo sitio [5]. Otro aspecto de gran importancia es la composición del residuo a tratar, los tres grupos principales de compuestos presentes en los hidrocarburos del petróleo (alifáticos, aromáticos y polares) tienen diferentes velocidades de biodegradación y algunos de ellos también presentan una marcada toxicidad para ciertos grupos bacterianos e inhiben su crecimiento [6]. La biodegradación puede complementarse con otras tecnologías que pueden en determinadas situaciones aumentar su eficiencia. La utilización de bacterias es factible, hay autores que han trabajado con mezclas de microorganismos a fin de optimizar la degradación [7, 8, 9], ya que son muestras complejas con hidrocarburos de cadenas largas.

El objetivo del trabajo fue estudiar la posibilidad de la degradación de los hidrocarburos presentes en los sedimentos que quedaron después del proceso de lavado del fondo de tanque por parte de la comunidad bacteriana presente en la muestra con agregado de nutrientes para favorecer el proceso.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Muestra de fondo de tanque.**

Se trabajó con fondos de tanque de la industria petrolera que habían sido tratados previamente con la técnica de lavado, que redujo el contenido de hidrocarburo. El fondo de tanque contenía un pH 7,5, humedad de 8,9%, residuo orgánico de 25%, residuo inorgánico de 75%, densidad aparente de 0,8, porosidad de 49%, capacidad de retención de agua de 64%, cloruros 32260ppm, bicarbonatos 226 ppm, sulfatos 2553 ppm, calcio 5511ppm, magnesio 1337 ppm, hierro 39ppm, amonio 18 ppm, fosfato 1,5 ppm e hidrocarburos totales del petróleo (TPH) 2,9% compuesto por 48, 35, y 17% de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares respectivamente.

### **2.2. Experiencia de biodegradación**

Se diseñaron bioreactores conteniendo 100gr de sedimento de fondo de tanque, por triplicado, a los cuales se les adicionó agua destilada y nutrientes en una relación 100:3:0,3 de carbono, nitrógeno y fósforo respectivamente. Se incubó a 28°C durante 80 días en frascos color caramelo en sistemas OxiTop para medición automática de consumo de oxígeno. A estos sistemas se los monitoreo, no solo por medición de consumo de oxígeno, sino también por conteo de bacterias totales y degradadoras de hidrocarburos y por cuantificación de hidrocarburos.

### **2.3. Enumeración de microorganismos**

El número de microorganismos fue determinado por la técnica de conteo en placa. Se utilizó una suspensión de 10 g de suelo en 90 mL de solución fisiológica estéril que se agitó 30 minutos a 150 r.p.m. Para bacterias totales se utilizó agar nutritivo (5g peptona de carne, 3g extracto de levadura, 12g de agar, 1000 mL de agua destilada, pH 7,2), para bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) se utilizó un medio mineral (solución I: cloruro de calcio 0,235 g, nitrato de potasio 0,427 g, sulfato de amonio 5 g, cloruro de magnesio hexahidratado 1 g, bicarbonato de potasio 1,2 g. Solución II: fosfato ácido di sódico dihidratado 0,5 g, fosfato monopotásico 0,5 g. Solución III: EDTA-Na 800 g, cloruro ferroso 300 g, cloruro de calcio hexahidratado 4 g, cloruro de manganeso tetrahidratado 10 g, sulfato cúprico 1g, permanganato de potasio dihidratado 3 g, cloruro de zinc 2 g, cloruro de litio 0,5 g) al cual se le agregó 30 µL de una mezcla de petróleo y gasoil 1:1 por diseminación en superficie que se denominó MBM-PGO [6].

### **2.4. Análisis de hidrocarburos.**

#### **2.4.1. Determinación por espectrofotometría infrarroja (FTIR).**

Sobre dos gramos de muestra mezclados con dos gramos de sulfato de sodio, se procedió a extraer los hidrocarburos presentes con tetracloruro de carbono durante 30 minutos por sonicación. El extracto orgánico obtenido se limpió con sílica gel para posteriormente realizar la lectura en el infrarrojo medio a  $2930\text{ cm}^{-1}$  según lo propuesto por la norma EPA 418.1.

#### **2.4.2. Determinación de hidrocarburos por Cromatografía Gaseosa (GC).**

Para determinar la composición de los hidrocarburos presentes se mezcló 2 g de muestra, 1 g  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y 10 ml de Hexano, la cual se filtró para separar la fase sólida y líquida. Seis mililitros del filtrado se evaporó cuidadosamente hasta sequedad, y se resuspendió con 50 µL de Hexano. Para la cuantificación se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3800 GC, con detector FID y una columna capilar VF-5ms (30 m, 0,25 mm, 0,2523 µm). La temperatura del inyector fue de 200°C y la del detector FID 300°C, se inyectó 1 µL. Los parámetros de corrida de la columna fueron los siguientes: 45 a 100 °C con un aumento de 5 °C/min y una segunda rampa de 100 a 275 °C a 8 °C/min. La temperatura final de 275°C y se mantuvo por 5 minutos.

### **2.5. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas.**

A partir de las placas de MBM-PGO utilizadas para conteo de bacterias, se aislaron e identificaron 90 cepas por metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) según el método Sherlock MIDI versión 6.0. La extracción de ácidos grasos de membrana se realizó sobre 40 mg de masa celular comenzando con una saponificación con alcohol metílico, hidróxido de sodio y agua (150 mL: 45 g: 150 mL). Posteriormente se realizó una metilación con ácido clorhídrico 6 N y alcohol metílico (325 mL: 275 mL), seguido de una extracción con n-hexano y metil terbutil éter (1:1). Finalmente se realizó un lavado con hidróxido de sodio y agua (10,8 g en 900 mL) de acuerdo a lo propuesto por el sistema de identificación (MIDI Newark, Del., USA).

Los ácidos grasos obtenidos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa. Para tal fin se utilizó una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud y 0,2 mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 series II GC (inyección splitless, presión inicial 10 psi, programa de temperatura: 170-288 °C a  $28\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , 288-310 °C a  $60\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , 1,5 min de permanencia a 310 °C, detector por ionización de llama). La integración de los picos se efectuó mediante el programa HP 10.01 Chem Station.

Los ácidos grasos fueron identificados utilizando el sistema Sherlock (versión 6.0) con el estándar Agilent "Calibration standards kit for the microbial identification system". La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico (MIDI).

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

El valor de pH se encontró dentro de los valores óptimos para el desarrollo bacteriano, entre 6,5 y 7,5. Se observó un alto contenido de cloruro, sodio y potasio, valores frecuentes dado que el petróleo de la zona se extrae en un 40% por recuperación secundaria por lo que está acompañado de agua de formación que es muy rica en sales [10] y que el petróleo de la cuenca posee una salinidad medida en cloruros de 2000-20000 ppm. Se ha comprobado que estos valores de salinidad pueden resultar tóxicos para algunos grupos de bacterias, desarrollando aquellos discretamente halófilos que presenten tolerancia a niveles de salinidad de 1 a 6% de cloruro de sodio [11]. Los valores de

densidad, tanto aparente como real, se observaron por debajo de los valores normales, de 1 a 1,8 para densidad aparente y 2,6 a 2,7 para densidad real, esto es debido al alto contenido de hidrocarburos en la muestra.

De un valor inicial de 2,9 % de TPH en la muestra de fondo de tanque, se logro reducir a un 0,4% por medio de la mineralización biológica (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de los recuentos de bacterias aeróbicas totales (BAT), de las bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH), hidrocarburos totales del petróleo (TPH) y consumo de oxígeno final.

Parámetro	Inicial	Final
BAT (UFC/gr)	1,60x10 <sup>5</sup>	4,90x10 <sup>3</sup>
BDH (UFC/gr)	1,27x10 <sup>6</sup>	8,76x10 <sup>4</sup>
TPH (%)	2,9	0,44
Consumo de oxígeno (ppm)	-	6400

La cromatografía gaseosa de la muestra inicial y la expuesta a biodegradación durante 80 días (Tabla 2) muestra que, a partir del tratamiento de biorremediación asistida, se logro una reducción del contenido de hidrocarburos pertenecientes al grupo de los n-alcános de 31%, obteniéndose en C13, C14 y C15 los más altos porcentajes de degradación, de 100%, 87% y 82% respectivamente. Los hidrocarburos poliaromáticos se degradaron más lentamente, logrando una degradación del 4,5%, la presencia de benzo-antraceno con niveles superiores a los exigidos para suelos industriales seria lo que limita la disposición final de estos, no en todos los fondos de tanque se encuentran valores tan elevados de este compuesto [12, 13].

Tabla 2. Análisis de hidrocarburos por cromatografía gaseosa del los sedimentos de fondo de taque al inicio al final del ensayo de biodegradación.

Hidrocarburos	ppm Inicial	ppm Final	% biodegradación
C13	21,167	0,000	100,000
C14	192,681	24,728	87,166
C15	466,232	81,324	82,557
C16	514,107	158,178	69,232
C17	1486,560	1387,921	6,635
C18	288,177	248,514	13,763
C19	624,138	154,944	75,175
C20	377,095	259,470	31,192
C21	327,058	204,673	37,420
C22	513,235	260,742	49,196
C23	623,938	595,594	4,543
C24	434,236	431,711	0,582
C25	404,857	347,498	14,168
C26	515,291	515,225	0
<b>n-Alcanos totales</b>	<b>6783,773</b>	<b>4670,523</b>	<b>31,152</b>
2-Metilnaftaleno	17,351	17,134	1,252
Acenaftileno	31,650	30,997	2,064
Acenaftaleno	19,096	19,024	0,374
Fenantreno	179,963	179,342	0,345
Antraceno	166,027	108,704	34,526
Fluorantreno	335,107	335,088	0,006
Benzo(a)antraceno	233,597	233,242	0,152
Criseno	282,962	282,991	0
<b>PAH totales</b>	<b>1265,754</b>	<b>1206,523</b>	<b>4,680</b>

El sedimento resultante del lavado del fondo de tanque presento una cantidad da bacterias compatible para el uso de este en procesos biológicos de degradación y valores normales encontrados en suelos patagónicos con procesos de biodegradación aceptables [14, 6]. Esta elevada concentración de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos indica un importante potencial de biodegradación

[15]. La identificación de cepas bacterianas a partir de sus ácidos grasos de membrana permitió observar la presencia de bacterias de los géneros *Micrococcus* sp, *Ochrhobactrum* sp, *Clavibacter* sp, *Kocuria rosacea*, *Bacillus* sp. y *Rhodococcus* sp. Todos microorganismos que poseen metabolismos con capacidad de degradar hidrocarburos. En los procesos de lavado previo al análisis de laboratorio se pierden bacterias por la temperatura y los detergentes utilizados aunque existe una población bacteriana capaz de soportar dicho proceso formada principalmente por bacterias gram positivas y algunas gram negativas. Predominó el género *Pseudomonas* sp. (35% de las identificaciones) que son ampliamente conocidas por poseer la habilidad de utilizar diversos sustratos xenobióticos, incluyendo los hidrocarburos [15, 16, 17, 18]. El género *Rhodococcus* (24% de las identificaciones) posee una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de di-oxigenasas sobre anillos aromáticos, así como la actividad de ruptura de catecol. Algunas cepas presentan también la vía del 3-oxoadipato. Lo anterior sumado a su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental lo hacen un excelente candidato para los tratamientos de biorremediación en suelos. Estas son bacterias degradadoras de hidrocarburos con alta resistencia a la desecación y adaptadas a sistemas ecológicos con bajo contenido de nutrientes y temperaturas bajas. Ambos géneros bacterianos se encuentran comúnmente presentes en suelos patagónicos [19]. En los recuentos bacterianos de las muestras de los biorreactores, luego de 80 días de mineralización, se observó un buen desarrollo, tanto de bacterias aerobias totales como de bacterias degradadoras de hidrocarburos. No se observan diferencias significativas ( $P < 0,5$ ) en los valores de los tres sistemas ya que el aumento de un logaritmo está dentro del error del método. Esto demuestra que la diferencia en el rendimiento de la biodegradación no se debe a una mayor población bacteriana sino a un incremento de su capacidad degradadora de hidrocarburos gracias al agregado de nutrientes [14].

#### 4. CONCLUSIONES.

El residuo proveniente del lavado de fondo de tanque contenía bacterias en cantidad suficiente para la biodegradación de hidrocarburos de la muestra, esta presentaba un predominio de los géneros *Pseudomonas* sp y *Rhodococcus* sp que junto a las condiciones de 20 % humedad y nutrientes en una proporción de 100:3:03 redujeron los hidrocarburos de 2,9 a 0,4 % medidos por el método EPA 418.1. La fracción de hidrocarburos de mayor degradación fue la de los hidrocarburos alcanos de cadena entre 13 a 26 átomos de carbono, siendo las fracciones aromáticas más difíciles de degradar por lo que requieren tratamientos más prolongados para obtener resultados satisfactorios o el complemento de otras técnicas como la electrobiorremediación [20, 21, 22].

#### 5. REFERENCIAS.

- [1] Wang, Z; Fingas, M; Yang, C; Christensen, J. (2006). *Environmental Forensics*. USA. 1° Edición. Elsevier Science (Ed.). USA.
- [2] Environmental Protection Agency. (1983). Method 418.1 (Spectrophotometric, Infrared): Petroleum Hydrocarbons Total Recoverable. USA.
- [3] Pucci, O; Bak, M; Peressutti, S; Klein, I; Härting, C; Alvarez, H; Wünsche, L. (2000). "Influence of Crude Oil Contamination on the Bacterial Community of Semiarid Soil of Patagonia (Argentina)". *Acta Biotechnologica*. 20, 2, 129-146. Alemania.
- [4] Pucci, O; Acuña, A; Pucci, G. (2013). "Biodegradación de residuos de estaciones de servicio y lavaderos industriales por la cepa *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp". *Acta Biológica Colombiana*. 18, 2, 251-258. Colombia.
- [5] Acuña, A; Pucci, O; Pucci, G. (2012). "Effect of nitrogen deficiency in the biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons in patagonian contaminated soil". *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. 11, 3, 479-485. Pakistan.
- [6] Pucci, G; Pucci, O. (2003). "Biodegradabilidad de Componentes de Mezclas Naturales de Hidrocarburos Previamente Sometidas a Landfarming". *Revista Argentina de Microbiología*. 35, 2, 62-68. Argentina.
- [7] Ferrari, M; Neirotti, E; Albornoz, C; Mostazo, M; Cozzo, M. (1996). "Biotreatment of hydrocarbons from petroleum tank bottom sludges in soil slurries". *Biotechnology Letters*. 18, 11, 1241-1246. Holanda.
- [8] Gallego, J; García-Martínez, M; Llamas, J; Belloch, C; Peláez, A; Sanchez, J. (2007). "Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia". *Biodegradation*. 18, 3, 269-281. Holanda.
- [9] Saikia, R; Deka, S. (2013). "Removal of hydrocarbon from refinery tank bottom sludge

- employing microbial culture". *Environmental Science and Pollution Research*. 20, 12, 9026-9033. Alemania.
- [10] Avellaneda, A. (1990). Petróleo e impacto ambiental en Colombia., *Revista de la Universidad Nacional*. 6, 24, 21-28. Colombia.
- [11] Meshler, M; Pucci, O. (2006). "Biodegradación de Hidrocarburos de la Comunidad Bacteriana en Condiciones de Alta Concentración en Sales de Sulfato". *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 89, 92-97. Argentina.
- [12] Bojes, H; Pope, P. (2007). "Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 47, 3, 288-295. USA.
- [13] Pucci, G; Acuña, A; Pucci, O. (2013). "Electro bioremediación de fondos de tanques petroleros". *Revista Peruana de Biología*. 20, 2, 199-201. Perú.
- [14] Acuña, A; Pucci, O; Pucci, G. (2008). "Caracterización de un Proceso de Biorremediación de Hidrocarburos en Deficiencia de Nitrógeno en un Suelo de la Patagonia Argentina". *Ecosistemas*. 17, 2, 85-93. España.
- [15] Atlas, R. (1981). "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". *Microbiological Reviews*. 45, 1, 180-209. USA.
- [16] Foght, J; Westlake, D. (1988). "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species". *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 10, 1135-1141. Canada.
- [17] Yan, P; Lu, M; Yang, Q; Zhang, H; Zhang, Z; Chen, R. (2012). "Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*". *Bioresource Technology*. 116, 24-28. USA.
- [18] Zhang, X; Xu, D; Zhu, C; Lundaa, T; Scherr, K. (2012). "Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains". *Chemical Engineering Journal*. 209, 138-146. USA.
- [19] Peressutti, S; Alvarez, H; Pucci, O. (2003). "Dynamics of Hydrocarbon-Degrading Bacteriocenosis of an Experimental Oil Pollution in Patagonian Soil". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 52, 21-30. Reino Unido.
- [20] Acuña, A; Pucci, O; Pucci, G. (2012). *New Technologies in the Oil and Gas Industry*. Croacia. 1° Edición. Intech. Croacia.
- [21] Pucci, G; Acuña, A; Wick, L; Pucci, O. (2012). "The use if electrobioremediation in hydrocarbon release and bioremediation". *International Journal of Current Research*. 4, 12, 451-454. India.
- [22] Pucci, G; Acuña, A; Wick, L; Pucci, O. (2012). "Electrobioremediation of Patagonian Soils contaminated with Hydrocarbon". *Portugaliae Electrochimica Acta*. 30, 5, 361-370. Portugal.