

BIODEGRADACIÓN DE FONDO DE TANQUES DE LA INDUSTRIA DE PETROLEO.

Tonin N; Pucci GN; Acuña AJ y Pucci OH

CEIMA - Universidad nacional de la Patagonia San Juan Bosco. ceima@unpata.edu.ar

Uno de los pasivos ambientales que debe sanearse son los llamados fondos de tanque (FTK) que contienen una mezcla de hidrocarburos provenientes del petróleo, arena y otros compuestos que precipitan en tanques de almacenamiento y en piletas. Una de las técnicas utilizadas es el lavado del residuo con diferentes productos químicos, acompañado de temperaturas de 50 a 60°C, que generalmente emulsionan o disuelven muchos de los hidrocarburos, si bien es un método rápido no elimina todos los residuos y muchas veces no cumple con la legislación vigente para su disposición final. En este trabajo se utilizó fondo de tanque con lavado a 60°C y otro de la misma procedencia sin lavar a los que se les aplicó biorremediación asistida y una tercera serie del fondo de tanque lavado a la que se le aplicó nutrientes y agregado de bacterias obtenidas del FT no lavado. Las bacterias inoculadas con capacidad de degradación de hidrocarburos fueron *Kocuria rosea*, *Micrococcus luteus*, *Gordonias* sp, *Clavibacter michiganensis*, *Ochrobactrum anthropi*. Los resultados indican que se produce una buena biorremediación en los tres casos siendo ligeramente menor en FT lavado sin inoculación. La conclusión de la experiencia indica que si hay tiempo suficiente, se pueden eliminar los hidrocarburos hasta los límites legales solo con biorremediación asistida con nutrientes.

INTRODUCCIÓN.

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado en todo el mundo un problema de contaminación de los 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 (Wang *et al.* 2006). El tratamiento de residuos contaminados con hidrocarburos es esencial para mantener la calidad del medio ambiente y la salud de la población.

Uno de los residuos generados por esta actividad son los llamados fondos de tanque, se trata de un producto acumulado en el fondo de los tanques de almacenamiento de petróleo, en piletas API y en otras instalaciones, formado por la precipitación de las partículas sólidas y las fracciones más pesadas del producto almacenado.

Hasta el momento, para el tratamiento de estos residuos se han aplicado productos a base de detergentes tensioactivos con el objeto de hacer un lavado y así separar la matriz (suelo, sedimento y agua) del hidrocarburo, de esta manera los hidrocarburos son recuperados, y el residuo sólido debe ser tratado para reducir el contenido de hidrocarburos antes de su disposición final.

Existe una gran variedad de tratamientos que pueden aplicarse. La biorremediación, que es un tratamiento biológico, es la herramienta más adecuada para la recuperación de estos residuos. Es una opción de bajo costo de operación que ha sido aplicada exitosamente en este tipo de contaminaciones en suelos patagónicos (Perezutti *et al.* 2003, Pucci *et al.* 2000).

Se cree que el proceso de lavado a 60°C aplicado al fondo de tanque elimina la comunidad bacteriana presente en este, y, que para lograr una biodegradación de los hidrocarburos presentes en el fondo de tanque tratado será necesario inocular bacterias con capacidades de biodegradar este tipo de contaminantes. Para comprobar esta hipótesis se realizará un análisis bacteriológico comparativo entre una muestra de fondo de tanque sin lavar y una muestra de fondo de tanque sometida al proceso de lavado a alta temperatura. Una vez realizada esta primera etapa se continuara con el análisis de degradación de los hidrocarburos presentes en el fondo de tanque con o sin inóculo bacteriano de acuerdo a los resultados obtenidos

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 (Pucci 1998). Otro aspecto de gran importancia es la composición del residuo a tratar, la experiencia en laboratorio muestra que los tres grupos principales de compuestos presentes en los hidrocarburos del petróleo tienen diferentes velocidades de biodegradación y algunos de ellos también presentan una marcada toxicidad para ciertos grupos bacterianos e inhiben su crecimiento (Pucci y Pucci 2003).

OBJETIVOS.

En el presente trabajo se determinará la capacidad degradadora de hidrocarburos de los microorganismos presentes en los residuos de fondo de tanque, para así evaluar la posibilidad de utilizar la técnica de biorremediación asistida como una alternativa ecológicamente compatible y de bajo costo para el tratamiento de estos residuos contaminados con hidrocarburos, antes de darles disposición final en los términos del decreto 993/07 de la Provincia del Chubut.

DESARROLLO.

Análisis de la incidencia del proceso de lavado en el cambio de la comunidad bacteriana de los fondos de tanque.

Muestras.

Se trabajó separadamente sobre dos muestras. La primera es una muestra de fondo de tanque, tomada previa al tratamiento de lavado, de aspecto líquido viscoso, a la que se la llamó fondo de tanque sin tratar. La segunda es una muestra de fondo de tanque tomada posterior al tratamiento de lavado, a la que se la llamó fondo de tanque tratado o fondo de tanque lavado. Es el residuo sólido, formado por partículas de arena y arcilla y un alto contenido de hidrocarburos.

Análisis Bacteriológico.

El análisis bacteriológico se realizó con el fin de conocer las cepas bacterianas presentes en cada muestra, poder compararlas y estudiar cual es la influencia del tratamiento de lavado sobre estas.

Recuentos Bacterianos.

Se tomaron muestras iniciales del fondo de tanque sin tratar y del fondo de tanque sometido a tratamiento de lavado. Se aplicó la técnica de recuento en placa por diseminación en superficie en Agar Nutritivo (5g peptona de carne, 3g extracto de levadura, 12g de agar, 1000mL de agua destilada, pH 7,2) y agar medio base mineral (5g cloruro de sodio, 0,5g fosfato dibásico de potasio, 0,5g fosfato diácido de potasio, 1g sulfato de amonio, 0,2g sulfato de magnesio, 15g de agar, 1000mL de agua destilada, pH 7,2) adicionado con petróleo-gasol. Se sembraron por duplicado diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} de la muestra de fondo de tanque tratado y fondo de tanque sin tratar. Se incubaron las placas en condiciones de aerobiosis, a 28°C, se observaron diariamente las placas y los recuentos se realizaron a los 15 días de incubación.

Aislamiento de Cepas Bacterianas.

Se realizó aislamiento de las colonias obtenidas, por agotamiento en superficie por estrías en placas de agar nutritivo TSBA (17g triptona, 3g peptona de soya, 5g cloruro de sodio, 2,5g fosfato dipotásico, 2,5g glucosa, 15g de agar, 1000mL de agua destilada, pH 7,2). Se incubaron las placas en condiciones de aerobiosis, a 28°C por 15 días, las cepas aisladas se conservaron en picos de flauta de agar nutritivo.

Identificación de cepas bacterianas.

La identificación de cepas bacterianas se realizó por determinación de los ácidos grasos bacterianos como metil ésteres por cromatografía gaseosa. Se utilizaron las cepas obtenidas en los aislamientos las cuales fueron nuevamente aisladas en placas de agar nutritivo TSBA, el aislamiento se realizó por estrías mediante dos repiques sucesivos. Se incubaron las placas en condiciones de aerobiosis, a 28°C durante 24h (Loffhagen *et al.* 2001, Pucci *et al.* 2004). Se realizó la extracción de ácidos grasos de membrana a cada una de las cepas utilizando 40mg de masa celular húmeda mediante la siguiente técnica (Härtig *et al.* 2005):

Saponificación: Se colocó 1mL de la solución de saponificación (45g de hidróxido de sodio en 150mL de alcohol metílico y 150mL de agua) en frasco de 45mL con tapa a rosca. Se suspendió en la misma 40 mg del pelet a ensayar, se agitó durante 10 segundos y se colocó en un baño de 100°C durante 5 minutos. Se agitó nuevamente durante 10 segundos y se volvió a colocar en el baño de 100°C hasta completar 30 minutos. Finalizado esto, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Metilación: Se colocó 2mL de la solución de metilación (275mL de alcohol metílico en 325mL de ácido clorhídrico 6N) por las paredes del frasco en forma lenta. Se agitó 10 segundos y se colocó en un baño a 80°C durante 10 minutos. Se dejó enfriar en un baño de hielo.

Extracción: Se agregó 1,25mL de la solución de extracción (n-hexano en metil terbutil éter 1:1). Se agitó por inversión durante 5 minutos, de forma lenta para no producir emulsión, para luego descartar la fase acuosa.

Lavado: Se agregó 3mL de la solución de lavado (10,8g de hidróxido de sodio en 900mL de agua destilada) en forma lenta y por las paredes del frasco, se agitó por inversión con cuidado de no formar una emulsión y se recogió la fase etérea en un dial precintado. Las muestras fueron almacenadas en freezer hasta realizar la cromatografía.

Condiciones de corrida cromatográfica: Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, se usó una columna capilar Ultra 2 de 25m de longitud, 0,2mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 (inyección “splitless”; presión inicial 10psi; programa de temperatura: 170-250°C a 5 C/min, 260-310°C a 40°C/min, 1,5min de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama) controlado por HP 3365 (Hewlett Packard). La integración de los picos se efectuó mediante HP 3365 Chem Station, los ácidos grasos fueron identificados con estándares Agilent “Calibration standards kit for the microbial identification system”. La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico. El análisis de los datos se realizó con el sistema de identificación SHERLOCK (MIDI Newark, Del, USA) (Pucci y Pucci 2006).

Análisis de la actividad bacteriana sobre los hidrocarburos.

Perfil de Utilización de Hidrocarburos.

Para determinar la capacidad de los microorganismos de crecer a expensas de diferentes hidrocarburos utilizados como única fuente de carbono y energía, se ensayaron una serie de hidrocarburos puros y fracciones destiladas del petróleo. Se utilizó un inóculo de cepas bacterianas obtenidas de los aislamientos de la muestra de fondo de tanque sin tratar en medio base mineral líquido (5g cloruro de sodio, 0,5g fosfato dibásico de potasio, 0,5g fosfato diácido de potasio, 1g sulfato de amonio, 0,2g sulfato de magnesio, 1000mL de agua destilada, pH 7,2), las cepas se seleccionaron al azar. Se incubaron en condiciones de aerobiosis, a 28°C, con agitación durante 30 días.

Hidrocarburos ensayados.

Destilados del petróleo: nafta, gasoil, kerosene, aceite lubricante, petróleo.

Hidrocarburos alifáticos lineales: pentano, hexano, heptano, octano, pentadecano, hexadecano.

Hidrocarburos alifáticos ramificados: pristano, isoctano, metil terbutil éter (MTBE).

Hidrocarburos cíclicos: ciclohexano, ciclohexanona.

Hidrocarburos aromáticos: benceno, xileno, tolueno, Benceno-Tolueno- Xileno (BTX).

Hidrocarburos poliaromáticos (PAH): fenantreno, naftaleno, antraceno, fluoreno.

Conociendo las capacidades de degradar hidrocarburos de las cepas no sometidas a tratamiento de lavado, se probó si la inoculación de estas cepas a una muestra de fondo de tanque tratado produce un incremento en la biodegradación.

Determinación en Equipo OxiTop®.

La utilización de un hidrocarburo puede ser estudiada midiendo el dióxido de carbono producido como resultado de la mineralización de la fuente carbonada, o midiendo el oxígeno consumido por los microorganismos en la realización del proceso. Dicha determinación resulta además, en una medición indirecta del crecimiento bacteriano (Van Hamme *et al.* 2003). Se utilizó un sistema de medición OxiTop®, este equipo se basa en la medición del consumo de oxígeno por parte de los microorganismos presentes en la muestra. El equipo consta de un cabezal que determina presión negativa, un frasco de cierre perfecto que impide el intercambio de gases con el exterior y una base con sistema de agitación magnética. Para este ensayo se colocaron 100g de muestra de fondo de tanque tratado en cada equipo, uno de estos equipos fue inoculado con las mismas cepas bacterianas utilizadas en el perfil de degradación de hidrocarburos provenientes de la muestra de fondo de tanque sin tratar, y el otro se ensayó sin inóculo bacteriano. Los dos sistemas fueron fertilizados con una cantidad de nutrientes necesaria para lograr una relación C:N:P de 100:3:0,3 y con agua destilada estéril para obtener una humedad del 20%. Los sistemas se incubaron a 28°C y se realizaron mediciones de consumo de oxígeno durante un mes. De esta forma se puede observar si la muestra de fondo de tanque tratado posee bacterias capaces de producir la biodegradación de los hidrocarburos presentes, o si es necesario inocular bacterias que no han sido expuestas al tratamiento de lavado.

Con los datos obtenidos en el análisis de la incidencia del proceso de lavado en el cambio de la comunidad bacteriana de los fondos de tanque, se decidió continuar las pruebas de biodegradación con la muestra de fondo de tanque tratado sin necesidad de inóculos bacterianos.

Análisis de biodegradación de hidrocarburos del fondo de tanque tratado

Análisis Físico-Químico Inicial.

Se preparó un extracto 1:2,5 sobre el que se realizaron las siguientes determinaciones:

Las determinaciones de humedad, densidad real, densidad aparente, porosidad, capacidad de retención de agua y de materia orgánica e inorgánica se realizaron según lo propuesto por García Trejo en 1981. La determinación de pH fue realizada potenciométrica con electrodo de vidrio, el contenido de sulfato turbidimétricamente basado en su precipitación en medio ácido. El carbonato y bicarbonato fueron determinados por titulación con ácido clorhídrico 0,1 N utilizando fenolftaleína y heleanina como indicadores. El calcio y magnesio se efectuaron por complejometría con EDTA, a pH 12, para el primero de ellos, utilizando murexida como indicador y a pH 10 con negro de ericromo T como indicador, para el segundo. El cloruro fue determinado por el método de Mohr, el ión amonio como azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno. El nitrito se determinó colorimétricamente con ácido sulfanílico y 1-naftilamina y el nitrato con brucina en presencia de ácido sulfúrico. El contenido de sodio y potasio se determinó por fotometría de llama y el de fosfato colorimetría con molibdato y ácido ascórbico en medio ácido. El hierro se determinó por método colorimétrico con tiocianato de potasio, permanganato de potasio y ácido clorhídrico (Acuña *et al.* 2008).

Análisis de Biodegradación.

Mineralización en medio sólido, Biorreactores.

Se realizaron tres biorreactores en medio sólido en los cuales se ensayaron 100g de muestra en distintas condiciones. Los sistemas II y III fueron fertilizados con una cantidad de nutrientes necesaria para lograr una

relación C:N:P de 100:3:0,3. En el biorreactor III se colocaron 500µL de dispersante de hidrocarburos “Twin 80”. Los biorreactores se incubaron a 28°C durante 80 días.

Biorreactor I: 100g de suelo con 20% de humedad.

Biorreactor II: 100g de suelo con 20% de humedad + nutrientes.

Biorreactor III: 100g de suelo con 20% de humedad + nutrientes + dispersante de hidrocarburos.

Recuentos Bacterianos.

De cada biorreactor se tomaron muestras del fondo de tanque sometido a mineralización biológica durante 80 días. Se aplicó la técnica de recuento en placa por diseminación en superficie en agar nutritivo y agar medio base mineral adicionado con petróleo-gasoil. Se incubaron las placas en condiciones de aerobiosis, a 28°C . Se observaron diariamente las placas y los recuentos se realizaron a los 15 días de incubación.

Análisis de Hidrocarburos.

Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH).

Se realizó ésta determinación por método EPA 418.1 en espectrofotómetro Infrarrojo, sugerido por el decreto 993/07 de la Provincia del Chubut.

Fraccionamiento de Hidrocarburos.

Inicialmente se realizó una extracción de los hidrocarburos contenidos en la muestra de fondo de tanque tratado utilizando un extractor soxhlet con tricloroetano como solvente de extracción durante 12 horas. Se utilizaron 0,3g del hidrocarburo obtenido para el fraccionamiento de los mismos por cromatografía en columna de sílica gel (kieselgel 60, 35-70 mesh, Merck). Las fracciones alifática, aromática y asfáltica se eluyeron con hexano, benceno y cloroformo-metanol respectivamente. El contenido de cada fracción se determinó gravimétricamente (Pucci y Pucci 2003).

Porcentaje de Eliminación de Hidrocarburos en Biorreactores.

Por medio de la técnica de determinación de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) Método EPA 418.1, se realizó la medición del contenido de hidrocarburos de las muestras de fondo de tanque tratado expuestas a mineralización biológica durante 80 días en los distintos biorreactores. Se compararon los resultados obtenidos con los valores iniciales y se determinaron los porcentajes de eliminación de hidrocarburos para cada biorreactor.

Análisis de Hidrocarburos por Cromatografía Gaseosa.

Se realizó cromatografía gaseosa según método EPA 8015D, para determinar y cuantificar los distintos hidrocarburos del petróleo presentes en la muestra del fondo de tanque tratado no expuesto a mineralización biológica y en la muestra de fondo de tanque tratado expuesta a mineralización biológica durante 80 días en el biorreactor II, para establecer los valores iniciales y comparar los resultados obtenidos. Para esta determinación se realizó una extracción de los hidrocarburos con equipo Soxhlet, método EPA 1664, se utilizó hexano como solvente de extracción. Se determinaron los siguientes hidrocarburos n- alcanos de 6 a 26 átomos de carbono, benceno, ciclohexano, isooctano, tolueno, p-xileno, m-xileno, o-xileno y pristano. También fueron determinados los hidrocarburos poliaromaticos naftaleno, 1-metil naftaleno, 2-metil naftaleno, acenaftileno, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluorantreno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)antraceno, benzo(k)fluorantreno, benzo(a)pireno y criseno.

Los hidrocarburos de menos de 6 átomos de carbono no son medidos por este método ya que se pierden en el momento de la extracción por su alta volatilidad. Los hidrocarburos asfálticos no se pueden medir por cromatografía gaseosa.

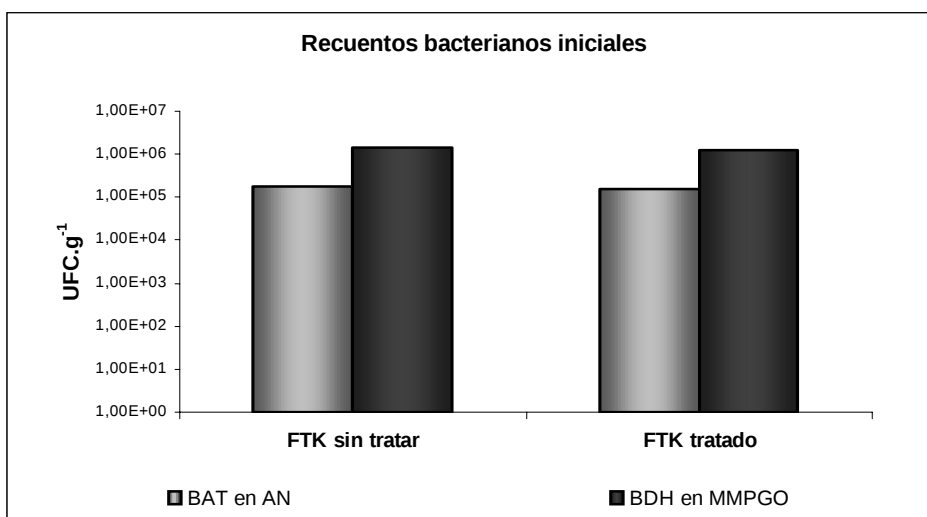
RESULTADOS.

Análisis de la incidencia del proceso de lavado en el cambio de la comunidad bacteriana en los fondos de tanque.

Análisis Bacteriológico.

Recuento de cepas bacterianas.

FIGURA 1: Recuentos iniciales de bacterias presentes en el residuo de fondo de tanque sin tratar y fondo de tanque tratado. Se puede observar que en ambas muestras el contenido de bacterias con capacidades de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono presenta un mayor desarrollo, esto muestra un importante potencial de degradación de los contaminantes tanto en la muestra no tratada como en la muestra sometida a tratamiento de lavado. AN: Agar Nutritivo, MBM-PGO: Medio Mineral adicionado con Petróleo-Gasol, UFC: unidades formadoras de colonias, BAT: Bacterias Aerobias Totales, BDH: Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos.



Identificación de Cepas Bacterianas.

TABLA 1: Identificación de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos de la muestra de fono de tanque sin tratamiento.

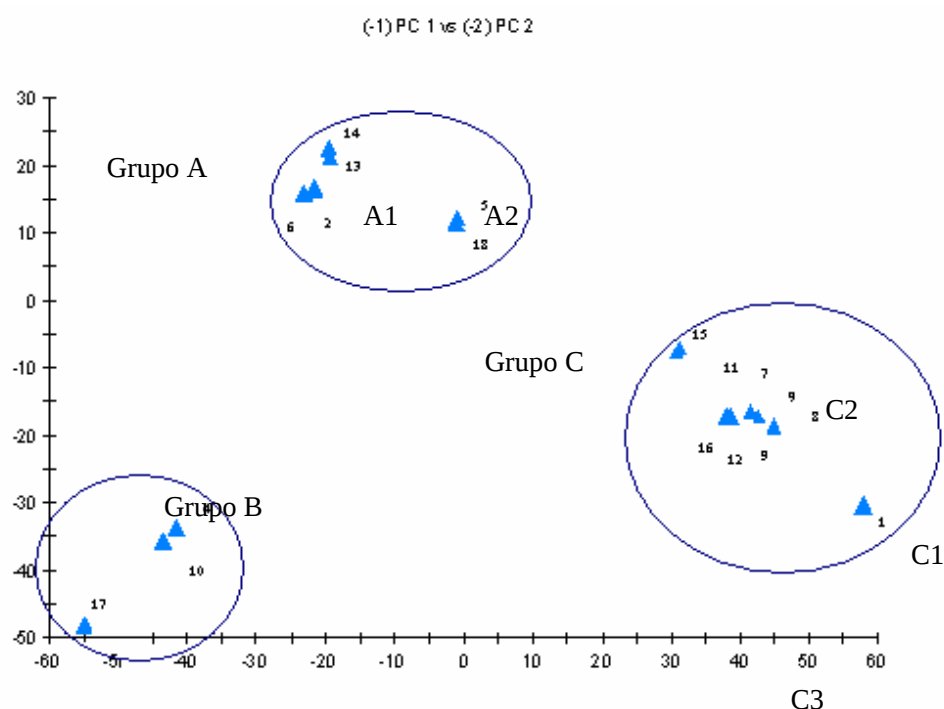
Cepa	Grupo	Identificación
06- NT-FTK-ST-30a	A1	Cepa no identificada por el sistema, por análisis de los ácidos grasos característicos se puede decir que es una cepa compatible con el género <i>Pseudomona</i> sp.
10- NT-FTK-ST-OXI-1	B	Cepa no identificada por no estar presente en la base de datos del sistema, por el análisis de los ácidos grasos característicos se puede decir que se trata de microorganismos relacionados con el género <i>Ocrobactrum</i> .
04- NT-FTK-ST-OXI-4		
17- NT-FTK-ST-OXI-2		<i>Ocrobactrum</i> .

15- NT-FTK-ST-27	C1	No identificada.
16- NT-FTK-ST-17b	C1	Cepa no identificada por el sistema, por análisis de los ácidos grasos característicos se puede decir que es una cepa compatible con el género <i>Clavibacter michiganensis - nebraskensis</i> .
12- NT-FTK-ST-30b	C1	Cepa no identificada por el sistema, por análisis de los ácidos grasos característicos se puede decir que es una cepa compatible con el género <i>Clavibacter michiganensis - nebraskensis</i> o <i>Cellulomona</i> .
09- NT-FTK-ST-OXI-3	C1	<i>Clavibacter michiganensis - nebraskensis</i> .
08- NT-FTK-ST-OXI-5		
03- NT-FTK-ST-OXI-6		
11- NT-FTK-ST-15		
07- NT-FTK-ST-17a	C2	<i>Kocuria rosasea</i> .
01- NT-FTK-ST-30c	C3	No identificada.

TABLA 2: Identificación de cepas degradadoras de hidrocarburos de la muestra de fono de tanque tratado.

Cepa	Grupo	Identificación
14- NT-FTK-TRAT-A-2	A1	Cepa no identificada por el sistema, por análisis de los ácidos grasos característicos se puede decir que es una cepa compatible con el género <i>Pseudomona</i> sp.
13- NT-FTK-TRAT-D-1		
02- NT-FTK-TRAT-E		
18- NT-FTK-TRAT-A-1	A2	<i>Rhodococcus</i> sp.
05- NT-FTK-TRAT-B		

FIGURA 2: Análisis del agrupamiento de las cepas bacterianas identificadas de las muestras de fondo de tanque tratado. A partir del análisis multivariado de componentes principales se puede observar como las cepas identificadas se separan claramente en tres grupos. El Grupo A esta formado principalmente por cepas provenientes de la muestra de fondo de tanque tratado, dentro de este grupo podemos encontrar géneros bacterianos como *Pseudomona* sp formando el subgrupo A1 y *Rhodococcus* sp formando el subgrupo A2. El Grupo B esta formado por cepas provenientes de la muestra de fondo de tanque sin tratar, esta formado por microorganismos del genero *Ocrobactrum*. El Grupo C esta formado por cepas provenientes de la muestra de fondo de tanque sin tratar, dentro de este grupo podemos encontrar géneros bacterianos como *Clavibacter michiganensis* - *nebraskensis* formando el subgrupo C1 y *Clavibacter michiganensis* - *nebraskensis* formando el subgrupo C2. El subgrupo C3 se encuentra formado por una cepa no identificada.



Análisis de la Actividad Bacteriana sobre los Hidrocarburos.

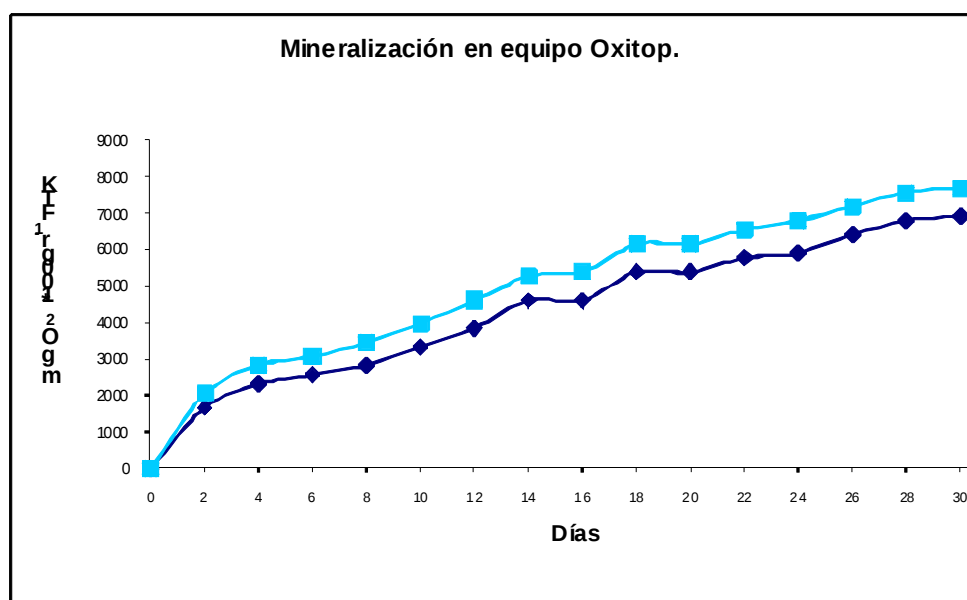
Perfil de utilización de hidrocarburos.

TABLA 3: Perfil de utilización de hidrocarburos por cepas bacterianas presentes en la muestra de fondo de tanque sin tratamiento luego de 30 días de incubación a 28°C con agitación. - : Sin desarroll +: Desarrollo positivo. ++: Desarrollo positivo y abundante.

Nafta	Gasol	Kerosén	Aceite lubricante	Petróleo	Pentano	Hexano	Heptano	Octano	Pentadecano	Hexadecano	Ciclohexano	Ciclohexanona	Pristano	Isotano	MTBE	Benceno	Xileno	Tolueno	BTX	Naftaleno	Antraceno	Fluoreno
+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Determinación en equipo OxiTop®.

FIGURA 3: Análisis de la actividad bacteriana sobre los hidrocarburos presentes en el residuo de fondo de tanque tratado, en equipo OxiTop. FTK: Fondo de tanque.



Análisis de biodegradación de hidrocarburos del fondo de tanque tratado

Análisis Físico-Químico Inicial.

TABLA 4: Análisis Físico-Químico del residuo de fondo de tanque tratado.

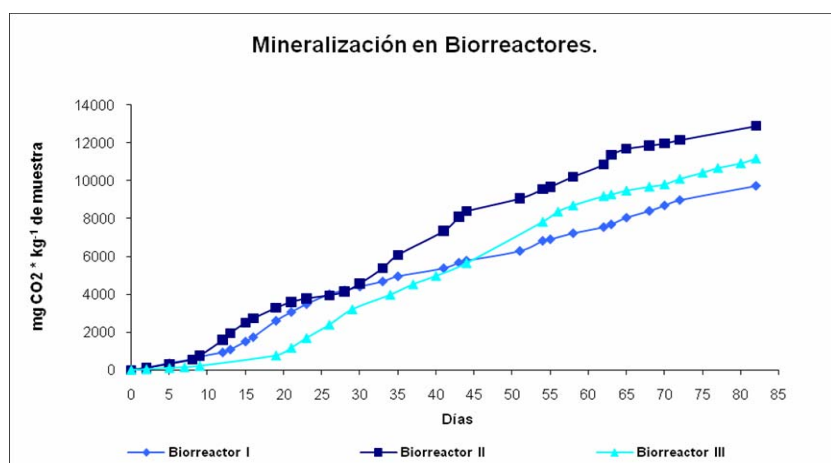
PARÁMETROS	UNIDAD	VALORES
pH	Unidades de pH	7,5
HUMEDAD	%	8.9
RESIDUO ORGÁNICO	%	25
RESIDUO INORGÁNICO	%	75
DENSIDAD APARENTE	(g/mL)	0,8
DENSIDAD REAL	(g/mL)	1,57
POROSIDAD	%	49
CAP. DE RET. DE AGUA	%	64
CLORUROS	mg.kg ⁻¹	32260
CARBONATOS	mg.kg ⁻¹	<1
BICARBONATOS	mg.kg ⁻¹	226
SULFATOS	mg.kg ⁻¹	2553
CÁLCIO	mg.kg ⁻¹	5511

MAGNESIO	mg.kg ⁻¹	1337
SODIO + POTASIO	mg.kg ⁻¹	17292
HIERRO	mg.kg ⁻¹	39
AMONIO	mg.kg ⁻¹	18
NITRATOS	mg.kg ⁻¹	<10
NITRITOS	μg.kg ⁻¹	<10
FOSFATOS	mg.kg ⁻¹	1,5

Análisis de biodegradación.

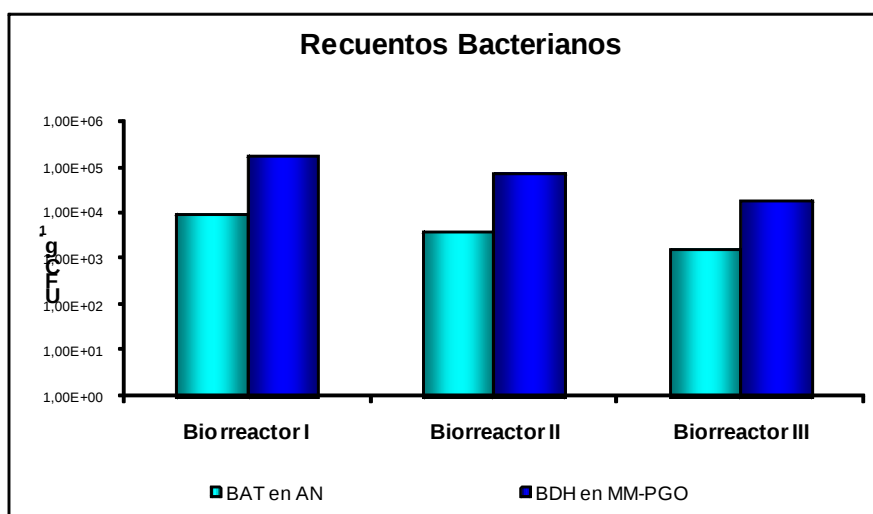
Análisis de la Actividad Bacteriana sobre Hidrocarburos.

FIGURA 4: Análisis de la actividad bacteriana sobre los hidrocarburos presentes en el residuo de fondo de tanque tratado, en las distintas condiciones ensayadas en biorreactores.



Recuentos Bacterianos.

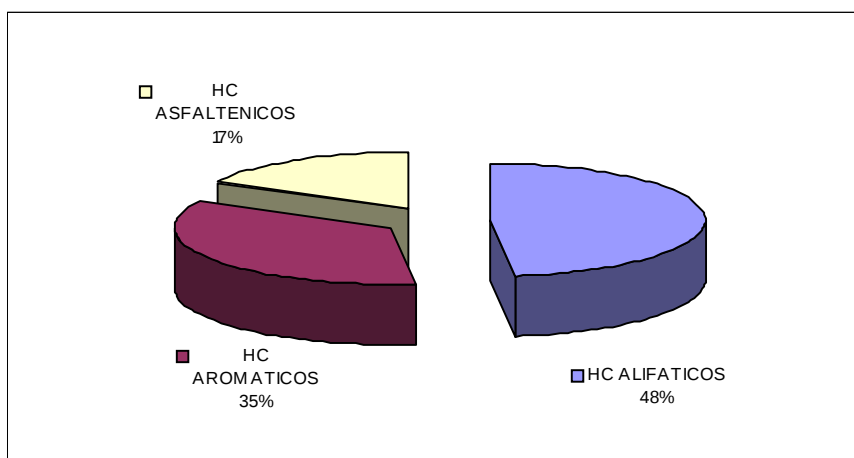
FIGURA 5: Recuentos de bacterias presentes en el residuo de fondo de tanque tratado, desarrolladas en Biorreactor I, Biorreactor II y Biorreactor III. AN: Agar Nutritivo, MBM-PGo: Medio Mineral adicionado con Petróleo-Gasoil, UFC: unidades formadoras de colonias, BAT: Bacterias Aerobias Totales, BDH: Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos.



Análisis de Hidrocarburos.

Fraccionamiento de Hidrocarburos.

FIGURA 6: Fraccionamiento de hidrocarburos presentes en el residuo de fondo de tanque tratado. HC: Hidrocarburos.



Hidrocarburos Totales del Petróleo.

TABLA 5: Análisis de hidrocarburos totales del petróleo presentes en el residuo de fondo de tanque tratado, en Espectrofotómetro Infrarrojo, método EPA 418.1.

PARAMETRO	mg*kg ⁻¹	%
HIDROCARBUROS TOTALES	29901	2,99

Porcentaje de Eliminación de Hidrocarburos en Biorreactores.

FIGURA 7: Análisis de hidrocarburos totales del petróleo presentes en el residuo de fondo de tanque tratado y de cada biorreactor, luego de 80 días de mineralización, determinados por Método EPA 418.1 en espectrofotómetro infrarrojo. FTK: Fondo de tanque inicial.

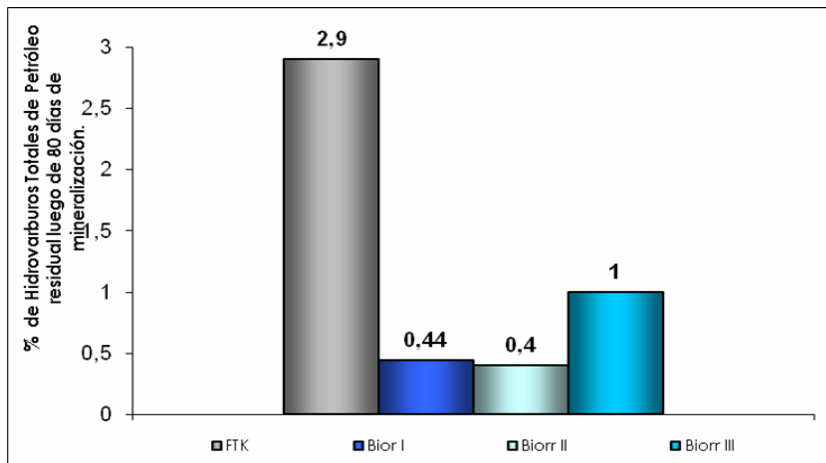
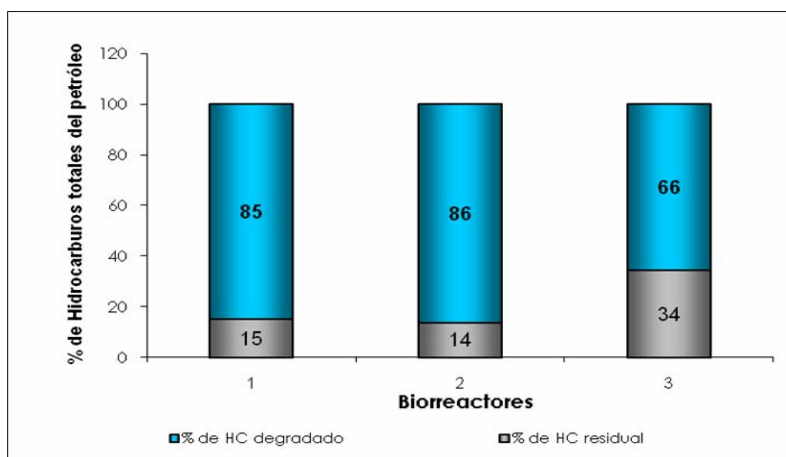


FIGURA 8: Porcentaje de degradación de hidrocarburos en cada biorreactor, luego de 80 días de mineralización, determinados por Método EPA 418.1 en espectrofotómetro infrarrojo. HC: Hidrocarburos



Cromatografía Gaseosa.

FIGURA 9: Cromatograma según método EPA 8015 D, para determinar y cuantificar los distintos hidrocarburos presentes en la muestra del fondo de tanque tratado, inicial, no expuesto a mineralización y en la muestra de fondo de tanque tratado expuesta a mineralización biológica.

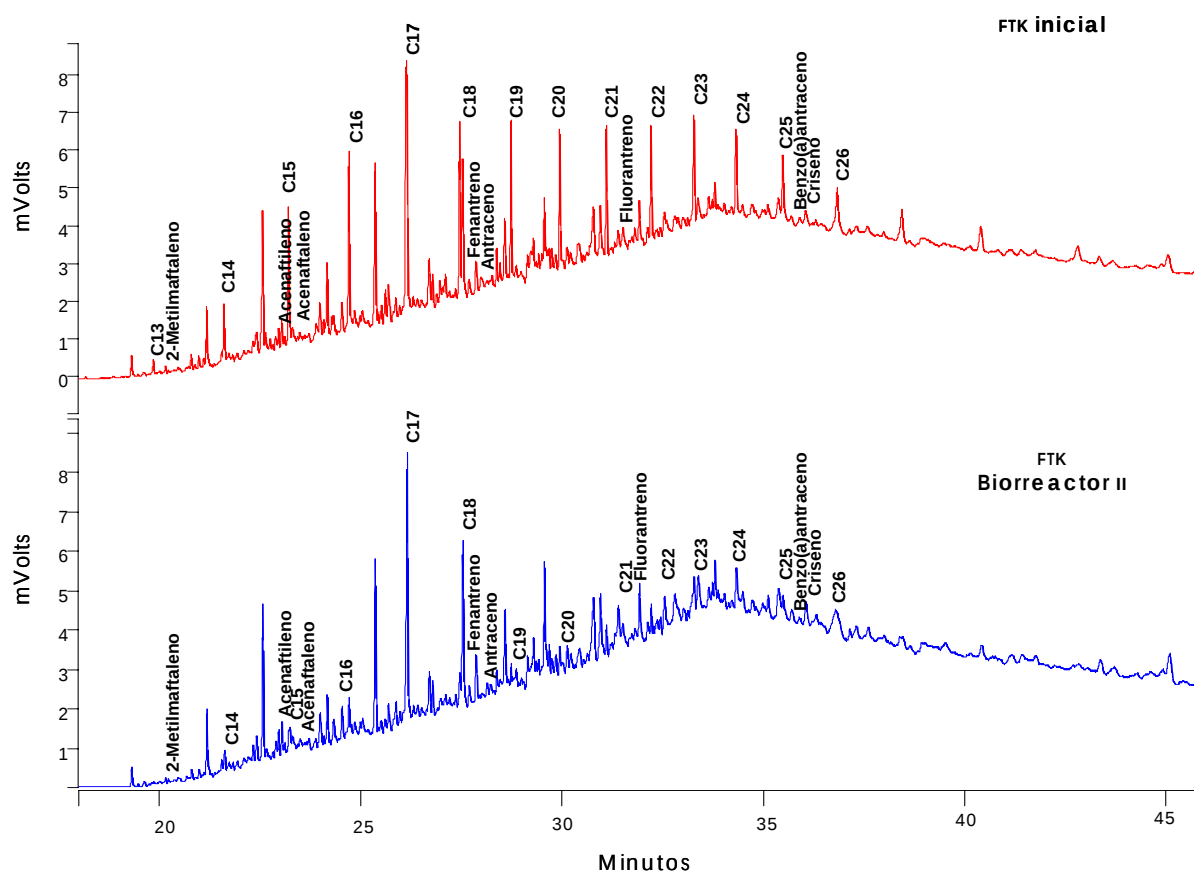


FIGURA 10: Hidrocarburos presentes en la muestra del fondo de tanque tratado, inicial, no expuesto a mineralización y en la muestra de fondo de tanque tratado expuesta a mineralización biológica durante 80 días en el biorreactor II. FTK: Fondo de tanque.

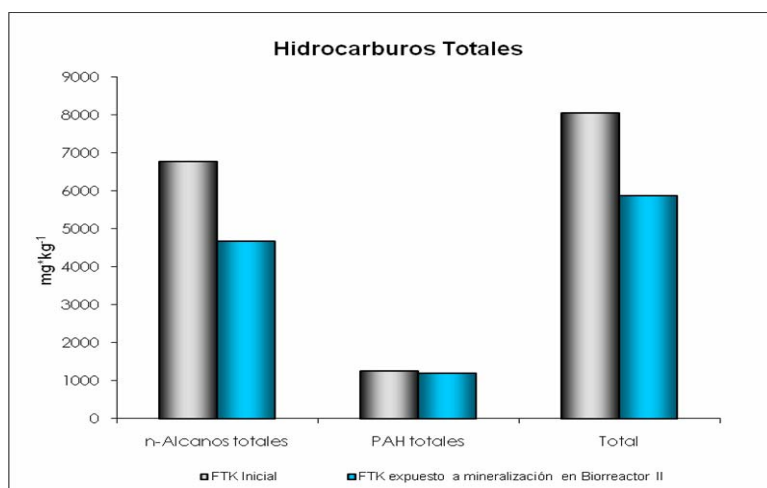


FIGURA 11: N-alcanos presentes en la muestra del fondo de tanque tratado, inicial, no expuesto a mineralización y en la muestra de fondo de tanque tratado expuesta a mineralización biológica durante 80 días en el biorreactor II. FTK: Fondo de tanque.

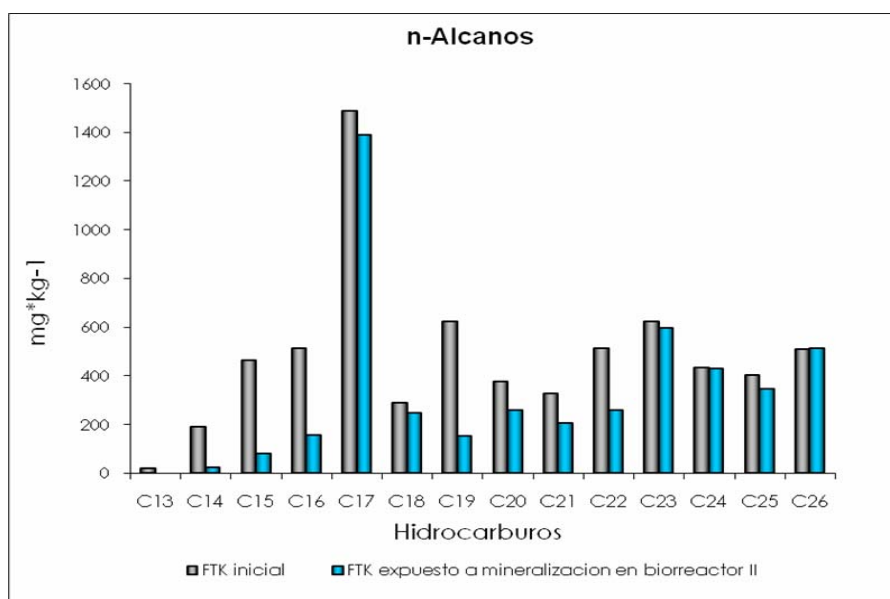
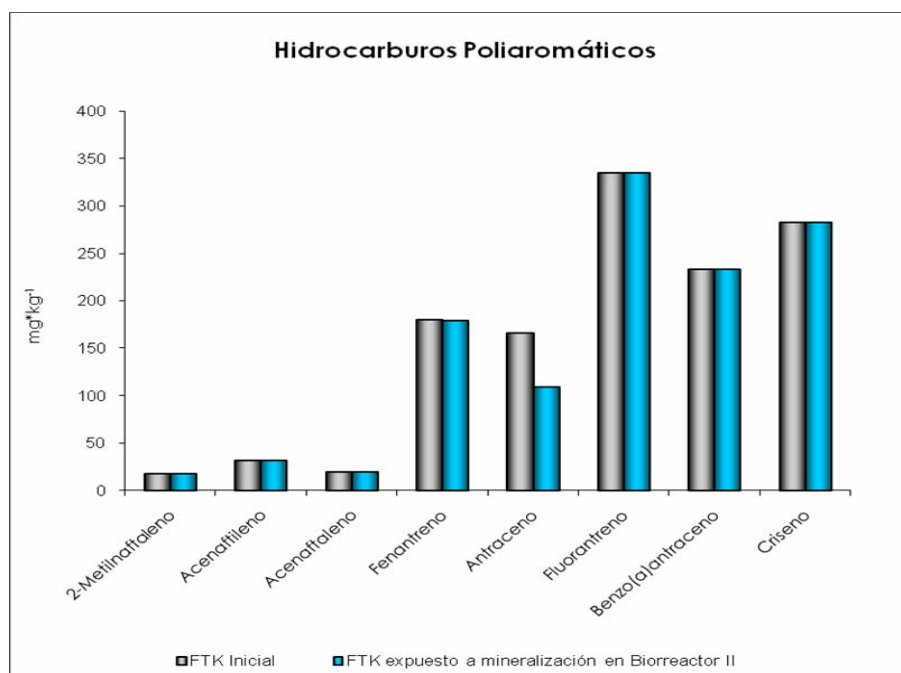


FIGURA 12: Hidrocarburos poliaromáticos presentes en la muestra del fondo de tanque tratado, inicial, no expuesto a mineralización y en la muestra de fondo de tanque tratado expuesta a mineralización biológica durante 80 días en el biorreactor II. FTK: Fondo de tanque.



DISCUSIÓN.

Tanto la muestra de fondo de tanque sin tratar como la muestra de fondo de tanque tratado, tienen una cantidad de bacterias aerobias heterótrofas del orden de 10^5 UFC/g, valores similares a los obtenidos comúnmente en suelos patagónicos (Acuña *et al.* 2008, Pucci y Pucci 2003). Estas bacterias son de desarrollo rápido para ser bacterias ambientales, ya que en 48h se obtiene el máximo desarrollo. Las bacterias con capacidad de desarrollar con hidrocarburos como única fuente de carbono y energía muestran un crecimiento más lento, y tienen una importante adaptación ya que tuvieron un mayor desarrollo. Esta elevada concentración de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos indica un importante potencial de biodegradación en ambas muestras (Atlas 1995, Bartha 1986).

La identificación de cepas bacterianas a partir de sus ácidos grasos de membrana permite observar que la muestra de fondo de tanque que no fue sometida al tratamiento de lavado presenta mayor diversidad bacteriana que la muestra de fondo de tanque tratado.

El estudio del agrupamiento de las cepas bacterianas muestra que no hay coincidencia entre la comunidad bacteriana encontrada en la muestra de fondo de tanque sin tratar, cepas pertenecientes a los grupos B y C, con las cepas bacterianas encontrada en la muestra de fondo de tanque tratado, pertenecientes al grupo A.

Se puede decir que el tratamiento de lavado aplicado al fondo de tanque inactiva o elimina a la comunidad bacteriana presente en este como se creía en un principio. Sin embargo, luego del lavado se produce la colonización de una nueva comunidad bacteriana capaz de adaptarse a estas condiciones adversas.

Las cepas identificadas de la muestra de fondo de tanque tratado, pertenecientes al grupo A fueron, en su mayoría, microorganismos del género *Pseudomonas* sp. Este tipo de bacterias se encuentran normalmente en el suelo y presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar substratos muy variados como fuente de carbono (Vos y de Ley 1983). Varias especies de este género contienen plásmidos en los que se encuentran codificadas enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo (Bhattacharya *et al.* 2003, Ghazali *et al.* 2004). Otro grupo de bacterias identificadas en esta muestra pertenecen al género *Rhodococcus* sp, son bacterias degradadoras de hidrocarburos con alta resistencia a la desecación y adaptadas a sistemas ecológicos con bajo contenido de nutrientes y temperaturas

bajas (Díaz-Ramírez *et al.* 2008). Ambos géneros bacterianos se encuentran comúnmente presentes en suelos patagónicos (Perezutti *et al.* 2003).

En el perfil de degradación de hidrocarburos se puede observar como las cepas bacterianas provenientes del fondo de tanque sin tratar presentan capacidades para degradar con facilidad los compuestos derivados del petróleo como nafta, gasoil, kerosén, aceite lubricante y petróleo, y los hidrocarburos alifáticos lineales de hasta 16 átomos de carbono como pentano, hexano, heptano, octano, pentadecano, hexadecano, necesitando mayor tiempo de adaptación para estos últimos. Los hidrocarburos alifáticos ramificados como pristano, isooctano, hidrocarburos cíclicos como ciclohexano, ciclohexanona, los hidrocarburos aromáticos como benceno, xileno, tolueno, la mezcla benceno-tolueno-xileno (BTX), y los hidrocarburos poliaromáticos como fenantreno, naftaleno, antraceno y fluoreno no son degradados por las cepas bacterianas en el tiempo de estudio, a excepción del metil terbutil éter. Estos resultados verifican el potencial de biodegradación de la comunidad bacteriana de esta muestra.

La mineralización en equipo OxiTop permite observar como el rendimiento de la mineralización aumenta con el agregado de inóculo bacteriano de cepas provenientes de la muestra de fondo de tanque sin tratar, aunque no se producen diferencias considerables en los resultados obtenidos en el sistema inoculado y el sistema sin inóculo. Esto demuestra que la inoculación de cepas bacterianas seleccionadas de fondo de tanque sin tratamiento de lavado no mejora la biodegradación del residuo de fondo de tanque tratado, por lo tanto no es necesario realizar inóculos bacterianos y el tratamiento de este residuo se puede llevar a cabo con las cepas presentes en él (Van Hamme *et al.* 2003).

Con los datos obtenidos, se decidió continuar las pruebas de biodegradación con la muestra de fondo de tanque tratado, ya que se comprobó que posee un alto potencial de biodegradación de los contaminantes y no es necesario realizar inóculos bacterianos.

Los resultados del análisis físico-químico de la muestra de fondo de tanque tratado muestran que los nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano como fósforo y nitrógeno se encuentran en bajas cantidades, por lo cual es aconsejable la fertilización para favorecer la biodegradación (Acuña *et al.* 2007).

El valor de pH está dentro de los valores óptimos para el desarrollo bacteriano, entre 6,5 y 7,5. Se observa un alto contenido de cloruros, sodio y potasio, valores compatible con los que presenta el agua que acompañan al petróleo, llamada agua de formación. 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 (Meshler y Pucci 2006). Los valores de densidad, tanto aparente como real, se observan por debajo de los valores normales, de 1 a 1,8 para densidad aparente y 2,6 a 2,7 para densidad real, esto se debe al alto contenido de hidrocarburos de la muestra.

En los ensayos de mineralización en biorreactores, se puede ver como los mejores resultados se obtienen en condiciones de humedad cercanas al 20% y con el agregado de nutrientes, como nitrógeno y fósforo en relación C:N:P de 100:3:0,3.

Del análisis de hidrocarburos totales del petróleo presentes en el fondo de tanque tratado y de cada biorreactor, luego de 80 días de mineralización, puede observarse que el biorreactor II es la muestra con menor contenido de hidrocarburos, esto concuerda con lo dicho anteriormente en cuanto a que la eficiencia de la biodegradación de los hidrocarburos aumenta en condiciones de humedad y agregado de nutrientes.

En los recuentos de las muestras de los biorreactores, luego de 80 días de mineralización biológica, se observa un buen desarrollo bacteriano en los tres sistemas, tanto de bacterias aerobias totales como de bacterias degradadoras de hidrocarburos. No se observan diferencias significativas en los valores de los tres sistemas. Esto demuestra que la diferencia en el rendimiento de la biodegradación de los hidrocarburos no se debe a una mayor población bacteriana sino a un incremento de su capacidad degradadora gracias al agregado de nutrientes (Acuña *et al.* 2008).

El fraccionamiento de los hidrocarburos muestra un alto porcentaje de hidrocarburos alifáticos lo cual hace más factible la biodegradación y se obtienen mejores rendimientos que en muestras con alto contenido de hidrocarburos aromáticos y asfálticos (Pucci y Pucci 2003).

La cromatografía gaseosa de la muestra inicial y la expuesta a mineralización biológica durante 80 días demuestran que los hidrocarburos que más se han degradado pertenecen al grupo de los n-alcános con una degradación del 30%, obteniéndose en C13, C14 y C15 los mas altos porcentajes de degradación, de 100%, 87% y 82% respectivamente. Los hidrocarburos poliaromáticos se degradan más lentamente, logrando una degradación del 5%, estos hidrocarburos requieren tratamientos mas prolongados para obtener resultados satisfactorios.

CONCLUSIONES.

A partir del análisis de los resultados obtenidos se puede concluir que:

El tratamiento de lavado aplicado al fondo de tanque elimina la comunidad bacteriana presente en este. Luego del tratamiento de lavado se produce la colonización de una nueva comunidad bacteriana en la que predominan los géneros *Pseudomonas* sp y *Rhodococcus* sp (Ambos reconocidos como eficientes en la degradación de hidrocarburos.

La capacidad degradadora de los microorganismos presentes en los residuos de fondo de tanque lavado indica que es posible la biodegradación de este residuo, sin necesidad de aplicar inóculos bacterianos.

La biodegradación de los hidrocarburos presentes en el residuo de fondo de tanque se favorece en condiciones de humedad cercanas al 20% con el agregado de nutrientes como fósforo y nitrógeno en una relación C:N:P de 100:3:0,3 y aireación periódica.

El proceso de biodegradación del fondo de tanque es mas efectivo en hidrocarburos alifáticos como los n-alcános de entre 13 y 26 átomos de carbono, siendo las fracciones aromáticas más difíciles de degradar por lo que requieren tratamientos mas prolongados para obtener resultados satisfactorios.

Se propone la técnica de biodegradación, en las condiciones mencionadas, como tratamiento para reducir el contenido de hidrocarburos de los residuos de fondo de tanque, haciéndolos aptos para darles disposición final en los términos del decreto 993/07 de la Provincia del Chubut.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña A, Pérez Krenek J, Pucci O, Pucci G (2007) Biodegradación de Hidrocarburos. Influencia de la Fertilización en el Proceso de Biorremediación. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. En Prensa.

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: 85-93.

Atlas R (1995) Bioremediation of Petroleum Pollutants. Intern. Biodet. and Biodeg. 317-327.

Bartha R (1986) Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. Microb. Ecol. 12: 155-172.

Bhattacharya D, Sarma P, Krishnan S, Mishra S , Lal B (2003) Evaluation of Genetic Diversity Among *Pseudomonas citronellonis* Strains Isolated from Oily Sludge-Contaminated Sites. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1435-1441.

Díaz-Ramírez I, Escalante-Espinosa E, Favela-Torres E, Gutiérrez-Rojas M, Ramírez-Saad H (2008) Design of Bacterial Defined Mixed Cultures for Biodegradation of Specific Crude Oil Fractions, Using Population Dynamics Analysis by DGGE. Internat. Biodet. Biodeg. 62: 21-30.

Environmental Protection Agency (1983) Method 418.1 (Spectrophotometric, Infrared): Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable.

Environmental Protection Agency (1999) Method 1664, Revision A: N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (SGTHEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry.

Environmental Protection Agency (2003) Method 8015D: Nonhalogenated Organics Using GC/FID.

- Ghazali F, Rahman R, Salleh A, Basri M (2004) Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Consortium. *Internat. Biodet. Biodeg.* 54: 61-67.
- Härtig C, Löffhagen N, Harms H (2005) Formation of trans Fatty Acids Is Not Involved in Growth-Linked Membrane Adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1915-1922.
- Löffhagen N, Härtig C, Babel W (2001) Suitability of the trans/cis Ratio of Unsaturated Fatty Acids in *Pseudomonas putida* NCTC 10936 as an Indicator of the Acute Toxicity of Chemicals. *Ecotoxicology Environ. Safety.* 50: 65-71.
- 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.
- Ministerio de Ambiente y Control del Desarrollo Sustentable (2007) Decreto 993/2007. Provincia de Chubut.
- Peressutti S, Alvarez H, Pucci O (2003) Dynamics of Hydrocarbon-Degrading Bacteriocenosis of an Experimental Oil Pollution in Patagonian Soil. *Intern. Biodet. and Biodeg.* 52: 21-30.
- Pucci G, Härtig C, Pucci O (2004) Influencia de la Concentración Salina y la Temperatura en la Composición de Ácidos Grasos de Membrana de *Pseudomonas fluorescens* GNP-OHP-3. *Rev. Arg. Microbiol.* 36: 6-15.
- Pucci G, Pucci O (2003) Biodegradabilidad de Componentes de Mezclas Naturales de Hidrocarburos Previamente Sometidas a Landfarming. *Rev. Arg. Microbiol.* 35: 62-68.
- Pucci G, Pucci O (2006) Cambios en los Ácidos Grasos de Membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con Diferentes Temperaturas y Osmolaridades. *Acta Biol. Colomb.* 11: 61-73.
- Pucci O (1998) Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. *Petrotecnia.* 6: 54-59.
- Pucci OH, Bak M, Peressutti S, Klein I, Härtig C, Alvarez H, Wünsche L (2000) Influence of Crude Oil Contamination on the Bacterial Community of Semiarid Soil of Patagonia (Argentina). *Acta Biotechnol.* 20: 129-146.
- Van Hamme J, Singh A, Ward O (2003) Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 67: 503-549.
- Vos P, de Ley J (1983) Intra- and Intergeneric Similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 487-509.
- Wang Z, Fingas M, Yang C, Christensen J (2006) Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. En: *Environmental Forensics*. Elsevier Science (Ed.). USA. pp. 339-357.