

# **BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ESTACIONES DE SERVICIO Y LAVADEROS INDUSTRIALES POR LA CEPA OHP-AL-GP**

**Oscar Héctor Pucci y Graciela Natalia Pucci**

CEIMA

Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

[ohpucci@yahoo.com](mailto:ohpucci@yahoo.com) // [o-pucci@uolsinectis.com.ar](mailto:o-pucci@uolsinectis.com.ar)

## **Resumen**

Los lavaderos industriales de equipos petroleros y las estaciones de servicio, en sus lavaderos, producen una gran cantidad de barros con concentraciones y calidades muy variables de hidrocarburos. La disposición final y segura de estos residuos es un problema en áreas de explotación petrolera.

El volumen de barros producidos hace que su eliminación por incineración sea altamente costosa y poco práctica. Los métodos biológicos son de relativo bajo costo, muy amigables para el medio ambiente y que a diferencia de la incineración no destruye el suelo, el que luego de eliminados los hidrocarburos biodegradables, puede destinarse a usos como forestación u otros usos industriales.

Se trabajó con fermentadores en fase sólida con barros provenientes de un lavadero industrial donde se estudió el potencial de biodegradación de la comunidad autóctona, con y sin asistencia de nutriente y con inoculación de una cepa con alto potencial de biodegradación.

Los resultados obtenidos de la experiencia indican que para los hidrocarburos ensayados, es posible la biodegradación de un 80% en un plazo relativamente corto, de 90 a 120 días. En las condiciones del este ensayo el porcentaje de biodegradación y la velocidad o cinética del proceso dependen de la composición del hidrocarburo, de las condiciones de manejo del sistema y de las ambientales.

## ***Introducción***

Los barros contaminados con diversas fracciones destiladas de petróleo provenientes de estaciones de servicio durante muchos años se los disponía en basurales u otros lugares sin tratamiento previo. En la ciudad de Comodoro Rivadavia, se han extremado esos controles, debido a que en esas instalaciones o en los llamados lavaderos industriales se acondicionan y lavan equipos de la industria petrolera. El grado de contaminación que producen es muy variable así como la composición, en la que entran naftas, gasoil, kerosene, aceites lubricantes y grasas cada uno de ellos con una composición muy compleja (Speight 1991). La disminución de estos contaminantes y el destino de esos barros en áreas de uso industrial o forestal es una posibilidad cierta.

Entre las fracciones de los destilados del petróleo que se encuentran en los barros de los lavaderos industriales la fracción correspondiente el aceite lubricante es una de las que presentaría mayor dificultad para su biodegradación debido a su composición. Esta fracción se caracteriza por tener una composición de hidrocarburos con cadenas de 25 y hasta 40 átomos de carbono incluyendo hidrocarburos alifáticos aromáticos y poliaromáticos como el naftaleno y fenantreno y también hidrocarburos mixtos aromáticos y parafínicos (Speight 1991).

Las naftas se obtienen por destilación a temperaturas de hasta 180°C y están compuestos por tres tipos principales de hidrocarburos, parafinas (incluidos ciclo parafinas y parafinas ramificadas, olefinas e hidrocarburos aromáticos. En total se estima en más de quinientos los hidrocarburos presentes. Todos ellos tóxicos para las membranas celulares incluidas las bacterianas son en general muy volátiles y desaparecen por evaporación en poco tiempo.

El kerosene, cuya deseable composición debiera ser sólo hidrocarburos saturados, tiene en su constitución parafinas normales, ramificadas, cíclicas con una, dos y tres ciclos y compuestos aromáticos, mono aromáticos sust. y diaromáticos. El kerosene se obtiene por destilación entre 200 y 260°C aproximadamente.

El diesel o gasoil con un rango de destilación entre 175 y 345°C, y esta compuesto por los mismos grupos de hidrocarburos que el kerosene al que se le agregan compuestos de mayor número de carbonos.

En trabajos anteriores se han discutido las posibilidades de los métodos de biorremediación en suelos semi-áridos de la patagonia (Pucci et al 1998, Pucci et al 2000, Riss et al 2002). Llegándose a la conclusión que es posible una buena biodegradación aún en climas y suelos con características extremas como los de la Patagonia central.

En los procesos de biodegradación en patagonia se presentan bacterias que tienen una estrategia de alta afinidad por sustratos y un desarrollo relativamente lento como las del grupo nocardia-rodococcus. Un de las características sobresalientes de este grupo son las capacidades de sobrevivir en medios hostiles, con períodos de muy baja humedad y de baja cantidad de nutrientes.

En este trabajo se realizó una experiencia con barros contaminados provenientes de un lavadero industrial y se ensayó la utilización de una cepa de buena capacidad de biodegradación y adaptación a suelos patagónicos en el saneamiento de barros contaminados con petróleo provenientes de estaciones de servicio, previo a su disposición final.

## ***Materiales y Métodos***

### **Muestra de un lavadero industrial,**

La muestra se componía de 16 submuestras de 3 Kgr cada una que se redujeron por cuarteos sucesivos a una de aproximadamente cinco kilogramos a partir de la que se prepararon los biorreactores sólidos.

### **Caracterización del residuo contaminante**

La extracción de hidrocarburos, a partir de los suelos contaminados, se efectuó por soxhlet, utilizando como solvente cloroformo, durante un período de 24 hs. La separación de las fracciones se realizó en columna de silicagel, eluyendo con hexano, benceno y cloroformo-metanol (1:1), separándose en fracciones de 25 ml en frascos de 30 ml. Se recupero el solvente

### **Determinación de la población bacteriana:**

Los recuentos de microorganismos y aislamientos de bacterias degradadoras de hidrocarburos se efectuaron a partir de suspensiones de 10 gr. de muestra y 100 ml. de agua destilada estéril, con agitación en vortex.

En todos los casos los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (ufc/g. suelo).

Se realizó, luego, diluciones decimales apropiadas a partir del sobrenadante.

Los medios de cultivo utilizados fueron

-Medio R<sub>2</sub>A: Extracto de levadura 0.5 g, peptona proteasa 0.5 g, casamino ácido 0.5 g, glucosa 0.5 g, almidón 0.5 g, piruvato de sodio 0.3 g, fosfato ácido di sódico 0.3 g, sulfato de magnesio decahidratado 5 g, agar-agar 14 g, agua destilada 1000 ml.

-Medio base mineral (MM):

Cl Na 5 g, PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 0,5 g, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> 0,5g, SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 1 g, SO<sub>4</sub>Mg 0.2 g, NO<sub>3</sub>K 1 g, Agua dest.c.s 1000 ml, con el agregado de las vitaminas B1 10 mgr, B6 10mgr y B12 1mgr y de solución de oligoelementos 20 ml por litro de una solución estéril de FeCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 1,500 g, ZnCl<sub>2</sub> 68,00mg, MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 100,00 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 62 mg, CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 120 mg, CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub> 17 mg, NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 24 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 24 mg, HCl, 0,05 molar 1000 ml. Agua destilada. pH 7, al cual se le agrego 30 microlitros de petróleo- gasoil por diseminación en superficie. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C antes de ser utilizados.

Se sembró cada placa por diseminación en superficie, se incubaron a 28 +/- 5°C durante todo su estudio.

### **Origen y obtención de la cepa:**

El aislamiento de la cepa se efectuó a partir de un suelo donde se trabajaba un minilandfarming y se procesaban desechos de hidrocarburos de diferentes procedencias en una planta distante a 400 km de Comodoro Rivadavia. Para el enriquecimiento de bacterias degradadoras se utilizó MM suplementado.

Se distribuyó a razón de 100 ml por frasco de 500 ml de capacidad y se agregaron 10 gr de suelo y por último 200 microlitros de aceite lubricante como única fuente de carbono y energía. Se incubó en agitador rotatorio a 150 rpm, 28°C durante 15 días. Al finalizar los mismos se traspasó 1 ml de la suspensión a 10 ml del mismo medio, se agregaron 20 microlitros de aceite lubricante, incubándose igual que el primer paso. Esto se repitió dos veces y por último se efectuó un aislamiento en el mismo

medio sólido con petróleo gasoil expandido. (Pucci GN y Pucci OP Revista de la Asociación Argentina de Microbiología, en prensa)

#### **Biodegradabilidad de hidrocarburos aromáticos y alifáticos**

Se determinó por cromatografía gaseosa (HP-6890-columna HP 1) a cuatro tiempos (inicial, a los 5, 10 y 20 días) utilizándose frasco de 30ml con 10 ml de medio de cultivo, 1 ml de inóculo (de absorbancia 0,5 a 700nm en cubeta de 1 cm de paso de luz) y 25 microlitros de un testigo preparado con gasoil, pristano, naftaleno y fenantreno. Para cada determinación se efectuó un duplicado. La extracción se efectuó durante 10 minutos con 2 ml hexano grado cromatográfico, en un agitador alternativo diseñado en el grupo.

#### **Estudio de la cinética de mineralización de hidrocarburos**

La cinética de degradación se efectuó midiendo el dióxido de carbono producido en un biorreactor en fase sólida que contenía 100 gr de suelo con el agregado de nutrientes nitrógeno y fósforo para llegar a una relación C:N:P igual a 100:5:1. Se prepararon cuatro variantes por duplicado que correspondían a suelo con nutrientes y humedad, suelo inhibido, suelo con nutrientes, y suelo con nutrientes, humedad e inoculación de cepa OHP-AL-GP. la mineralizaciones se determinaron dos veces por semana. Y se graficaron los promedios.

#### **Producción de biomasa a partir de hidrocarburos**

Se utilizaron fracciones de hidrocarburos e hidrocarburos puros, en total se efectuaron veinticuatro ensayos por duplicado (Petróleo, nafta, kerosene, gasoil, parafina, aceite mineral, pentano, hexano, heptano, n-octano, n-pentadecano, n-hexadecano, pristano, ciclohexano, ciclohexanona, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, antraceno, fenantreno, benzoato, m-toluoato, asfaltenos).

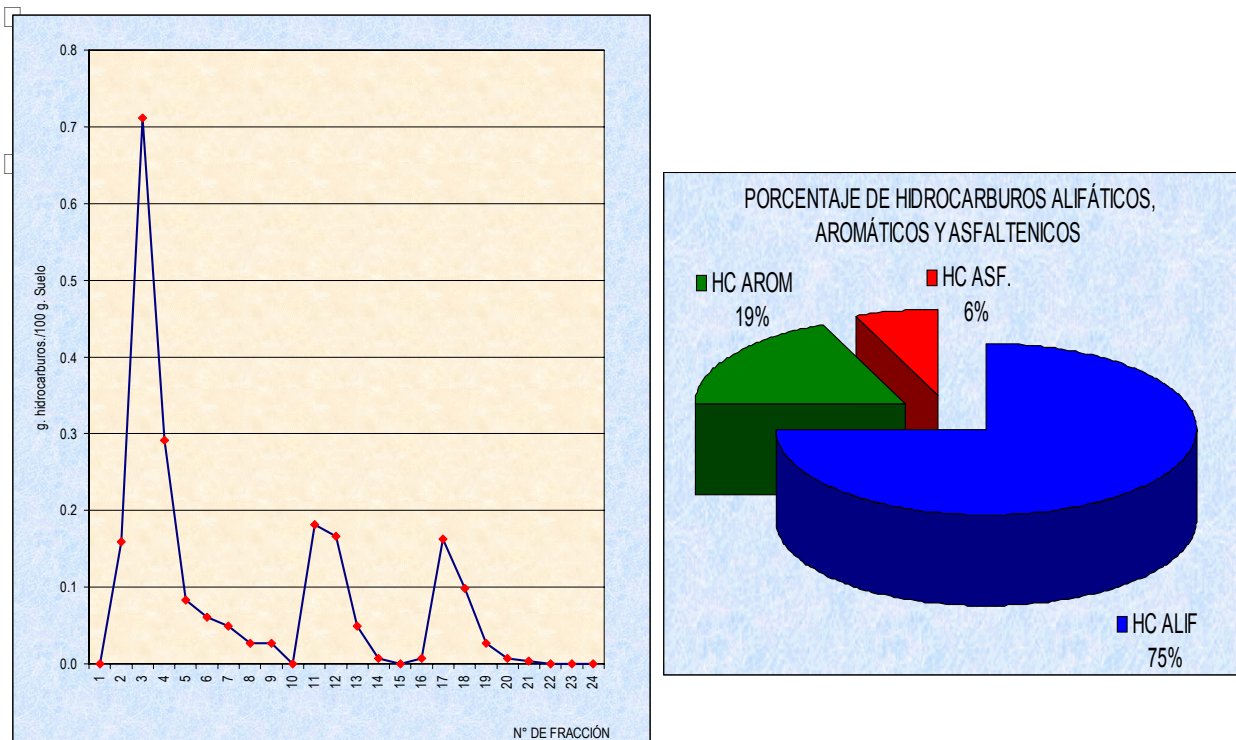
Cada uno de los ensayo se realizó en frascos de 30 ml, con 10 ml de medio base mineral se precintaron y se esterilizaron en autoclave. Cada uno de los frascos se inoculó con 100 microlitros de la cepa usada en la inoculación con una concentración de hidrocarburos de 0,5% salvo en el caso de los de menos de 8 átomos de carbono que fue de 0,1% por la toxicidad intrínseca de ellos.

La biomasa fue determinada por densidad óptica a 405 nm en espectrofotometro Merck LQ 118, correlacionándose en 3 casos el número de bacterias con densidad óptica para sacar un factor que pudiera transformar ese valor en unidades formadoras de colonias por ml. La correlación se efectuó midiendo densidad óptica de 3 cultivos en 3 diferentes tiempos y contrastándola con recuentos bacterianos efectuados por triplicado en placa con medio mineral suplementado con petróleo gasoil como única fuente de carbono y energía.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

### Caracterización del residuo:

**Figuras 1a y 1b: Composición de residuos por cromatografía en columna y los porcentajes respectivos a cada fracción.**



El análisis por cromatografía en columna de los hidrocarburos presentes indicó los siguientes porcentajes alifáticos 75% aromáticos 18,6% polares y asfálténicos 6,4% esta composición es apta para el tratamiento biológico. El bajo contenido en compuestos polares, que son los que presentan mayor recalcitrancia. Es un buen índice para obtener un alto porcentaje de biodegradación, La cantidad de hidrocarburos alifáticos, frascos 1 a 10, es del 75% es un porcentaje elevado y que corresponde a la misma fracción de nafta, kerosene, gasoil y aceite lubricante. Salvo la primera fracción destilada el resto tienen una excelente performance de biodegradación.

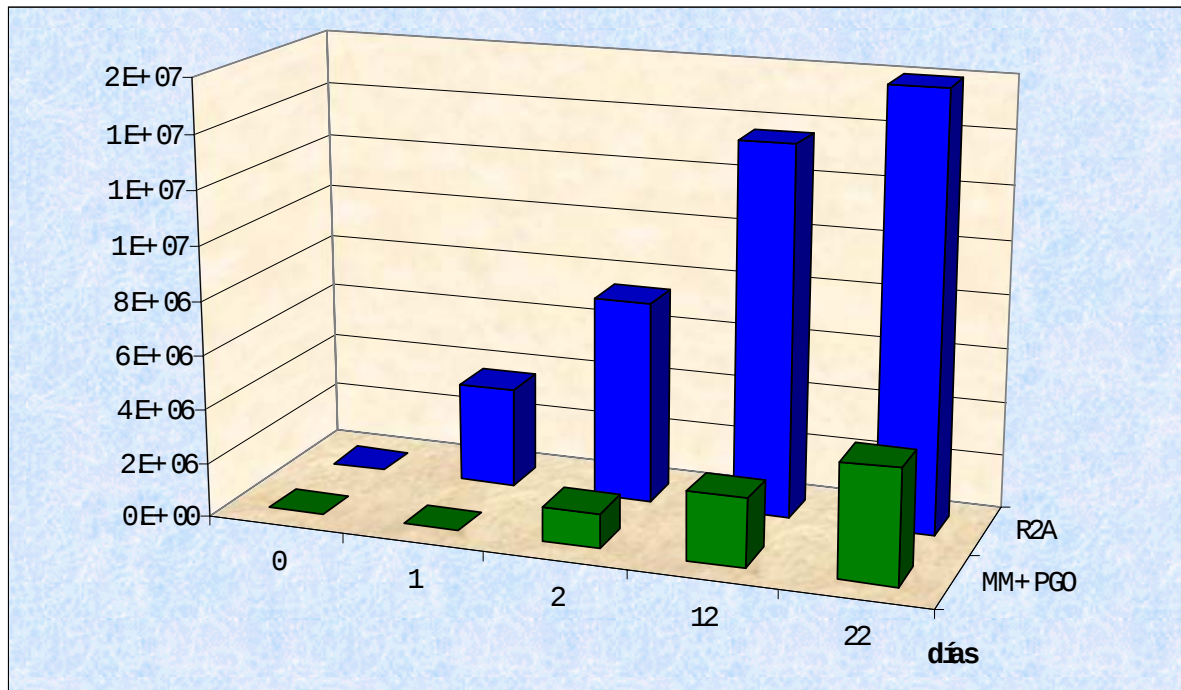
Los hidrocarburos aromáticos (frascos 10 a 16) contribuyen a un 18%, estos hidrocarburos se ven tienen mayor dificultad de degradación en las comunidades en general hay bacterias que pueden metabolizarlos, aunque a velocidades menores se puede obtener una buena eliminación de estos compuestos (Pucci, G.N.; Pucci, O.H. Rev.Arg.de Microbiología, 35-2. En prensa).

Los hidrocarburos polares integran con sólo un 6,4%. Estos compuestos tienen una velocidad de biodegradación muy baja y éste método no es el más adecuado para eliminarlos, pero son altamente insolubles y forman grandes moléculas de características similares al humus. Esta conformación molecular es la que induce su alta persistencia.

Población bacteriana inicial:

Figura 2 Poblaciones bacterianas de bacterias degradadoras de hidrocarburos y de bacterias heterotróficas en las muestras de barro

□



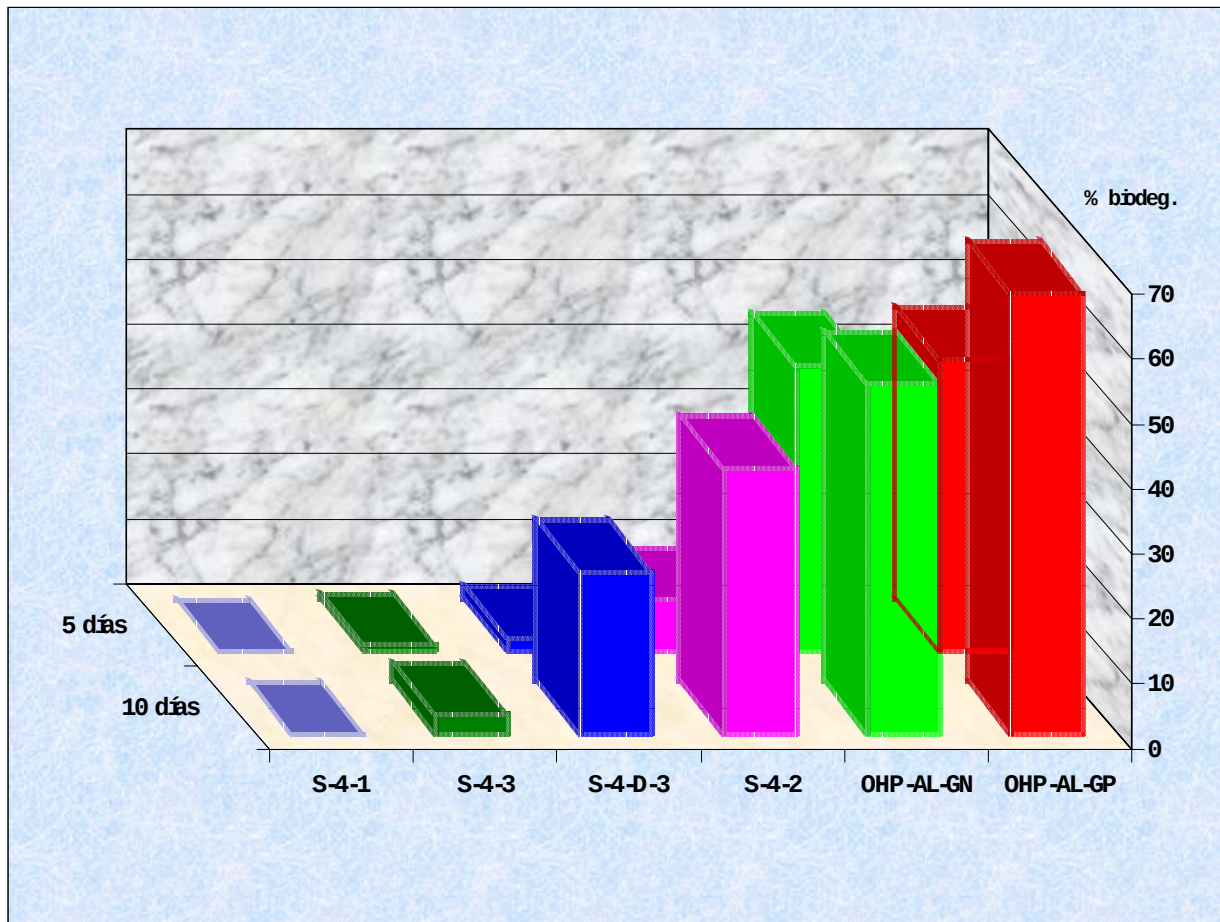
#### **Análisis Microbiológico:**

Los recuentos bacterianos están en el orden de  $10^7$  para bacterias aerobias que desarrollan en R<sub>2</sub>A y de  $10^6$  para bacterias que desarrollan en medio mineral suplementado con oligoelementos, vitaminas y petróleo-gasol. En medio sabouraud el desarrollo fue solo de aspergillus y penicillium, que no tuvieron significado en biodegradación de compuestos aromáticos o polares (datos no mostrados).

Se aislaron 58 cepas que degradan hidrocarburos. En los ensayos de biodegradación demostraron tener una capacidad individual buena, pero no excelente por lo que se trató de buscar una cepa proveniente de una contaminación con hidrocarburos de mayor peso molecular para reforzar la capacidad mineralizante de la comunidad presente (ver selección de cepas).

#### **Aislamiento y selección de cepas**

Figura 3: Porcentaje de degradación de hidrocarburos a los 5 y 10 días de cepas obtenidas de suelos contaminados con aceite lubricante



Con el objeto de obtener cepas con alta capacidad mineralizante se trabajó con un suelo proveniente de un pequeño Landfarming en el que se tratan suelos contaminados con aceite de turbina. Se aislaron 6 cepas que desarrollaban en MM suplementado con petróleo y gasoil (Pucci y Pucci. Rev.Arg. de Microbiología. En prensa).

A las 6 cepas se le efectuaron ensayos por duplicado de mineralización a 5 y 10 días para determinar la más óptima.

Las cepas OHP-AL-GN y OHP-AL-GP fueron las que mejor performance de mineralización presentaron.

Con el fin de seleccionar entre ambos la que ofreciera mejor performance de biodegradación se efectuaron pruebas de cinéticas de degradación con ambas cepas con aceite lubricante y gasoil, los resultados de estas mineralizaciones se muestran en la figura 4.

La performance de la cinética de la cepa OHP-AL-GP, la hace una cepa con especiales posibilidades de biodegradación, en especial por la gran capacidad de biodegradación de hidrocarburos alifáticos de peso molecular elevado como los presente en aceite lubricante, que junto con una

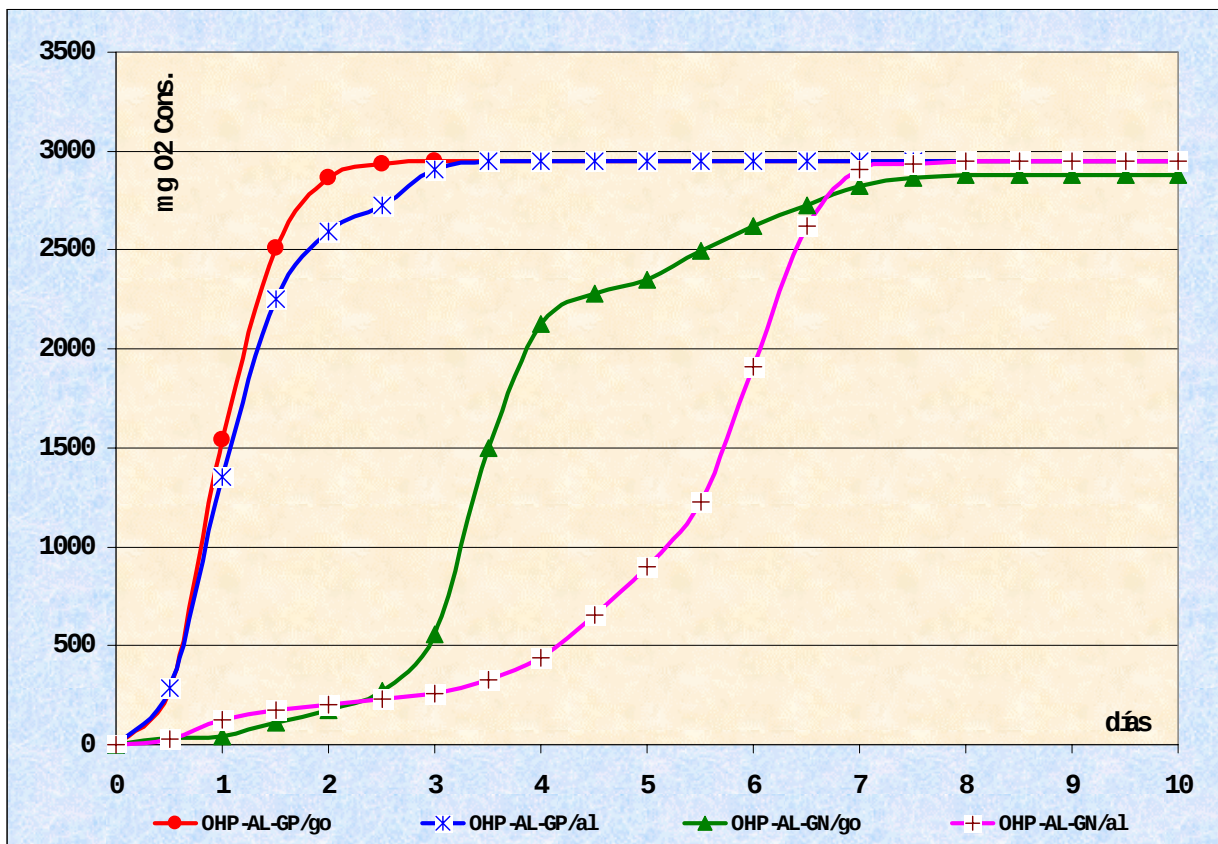
importante tasa de consumo de oxígeno la hace óptima para la inoculación. Para confirmar estas características sobresalientes se efectuaron 2 ensayos más avanzados.

El primero (figura 5.a. cinética de degradación de destilados de petróleo por la cepa OHP-AL-GP) fue la biodegradación de hidrocarburos puros y mezclas provenientes de destilación, utilizó con buena performance los destilados de petróleo: aceite lubricante, gasoil, kerosene, no utiliza nafta. Entre los hidrocarburos puros utilizó n-heptano, n-octano, n-pentadecano, n-hexadecano, pristano. No utilizó como única fuente de carbono y energía: ciclohexano, ciclohexanona, benceno, tolueno, xylene, naftaleno, antraceno, fenantreno, benzoato, m-toluoato, asfaltenos).

El segundo fue el estudio de las capacidades de biodegradación, se estudio la biodegradación de una mezcla compleja de hidrocarburos formada por gasoil, naftaleno, antraceno, pristano.

En la figura 6.a. se muestra la cromatografía de la mezcla de hidrocarburos extraída de un frasco preparado en las mismas condiciones del ensayo, en la que aparecen hidrocarburos de C<sub>9</sub> a C<sub>24</sub>.

***Figura 4: Capacidad de mineralización de mezclas complejas de hidrocarburos***



#### ***Cinética de mineralización de aceite lubricante y gasoil***

En la figura 4 se grafican las mineralizaciones de gasoil y aceite lubricante, que a pesar de la diferencia de composición, presentan cinéticas casi iguales, no ocurre lo mismo con otros hidrocarburos (cinéticas no mostradas).

**Figura 5.a. y 5.b.: Producción de biomasa en función de la utilización de hidrocarburos puros.** En ambas se grafica unidades de absorvancia (eje y) días de la experiencia (eje x)

Figura 5 a

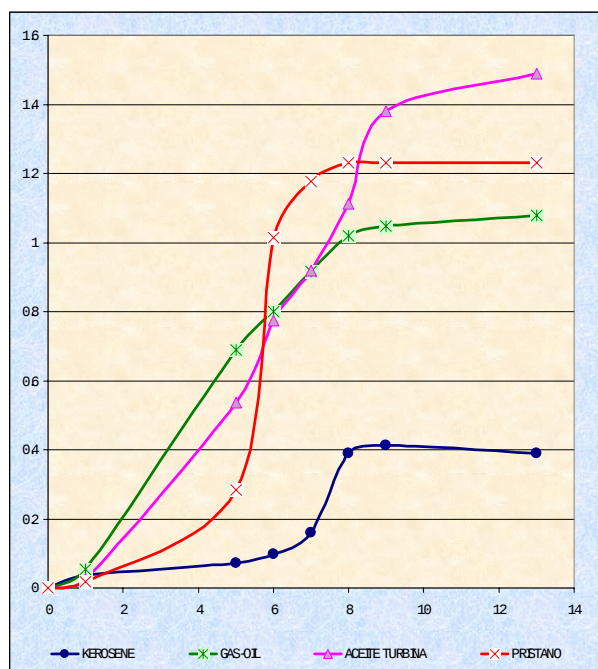
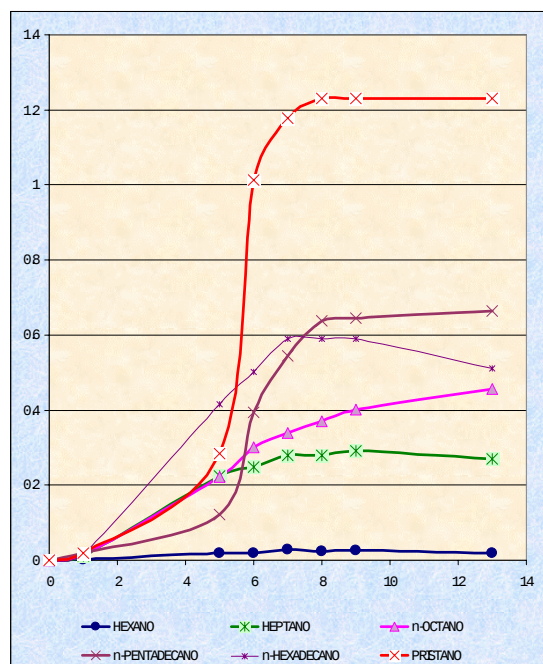


Figura 5 b

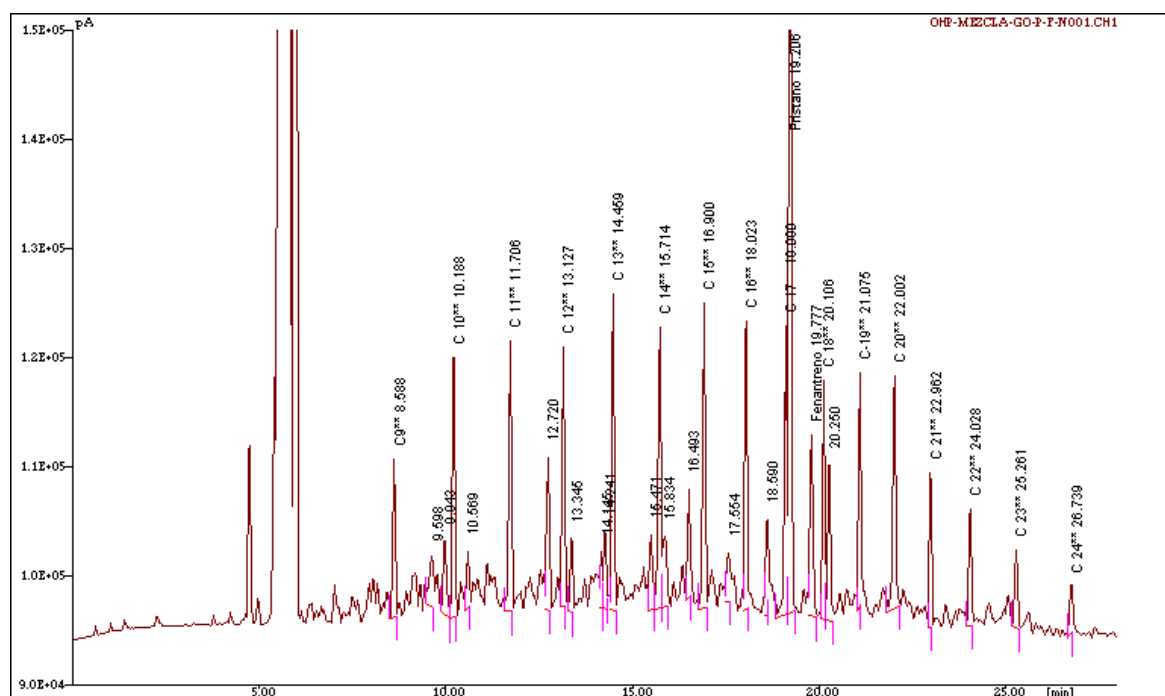


**Figura 6.a, b, c y d.: Biodegradabilidad de hidrocarburos aromáticos y alifáticos.**

Se presentan los datos en las figuras 2 a, b, c, d que corresponden a las cromatografías a testigo inicial, b a los 5 días, c a los 10 días y d a los 20 días de incubación.

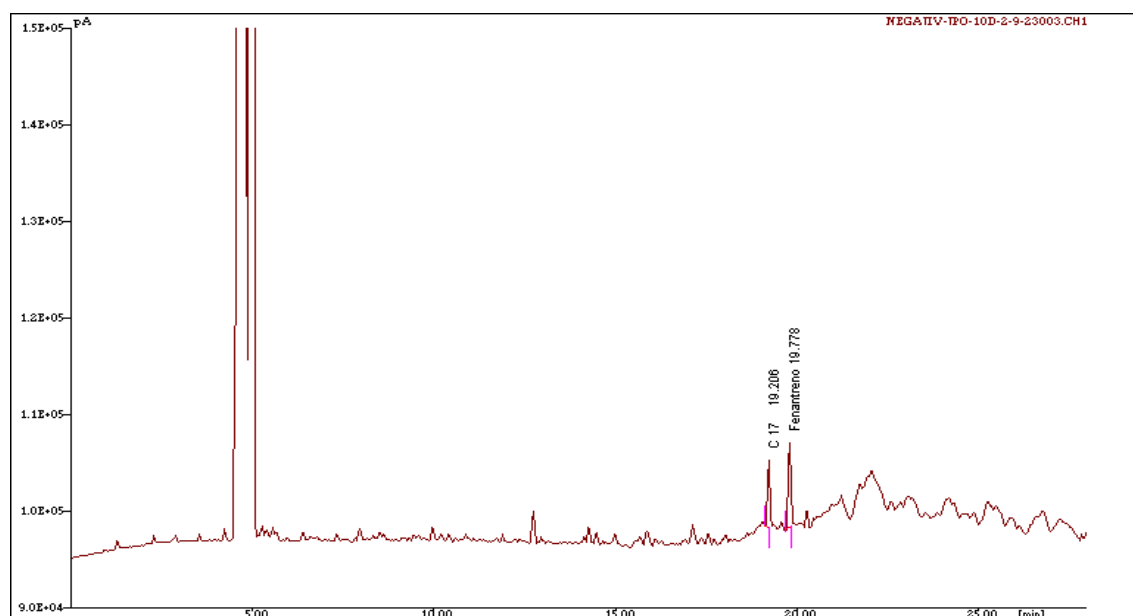
**Figura 6.a.**

□

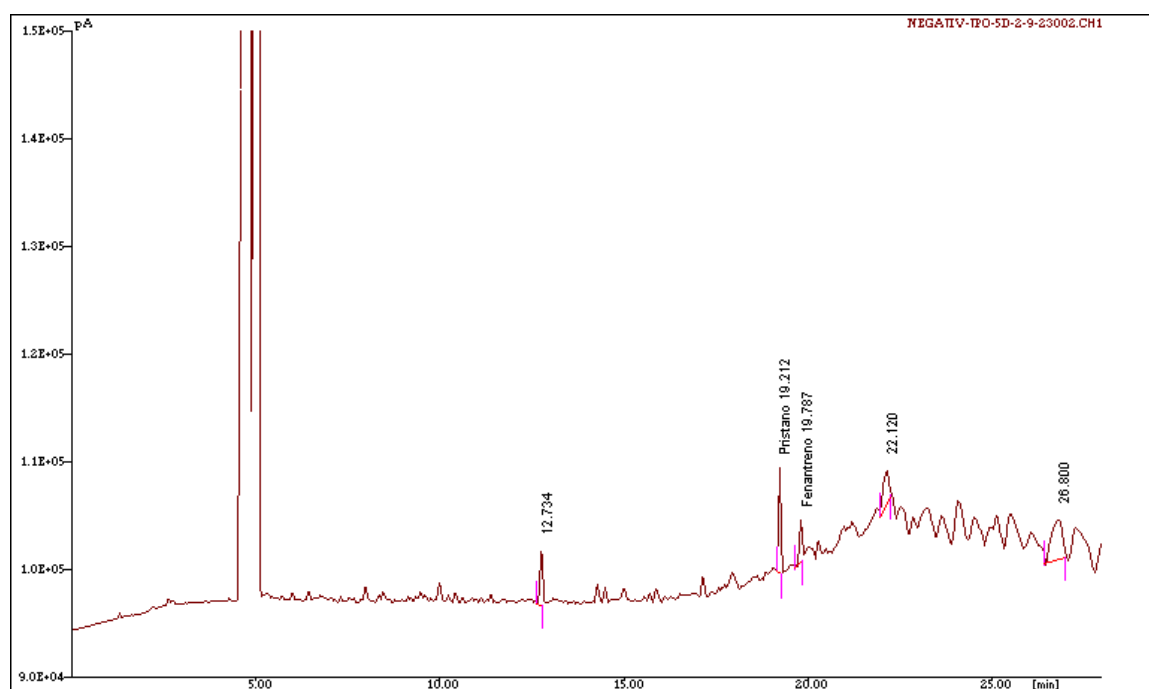


**Figura 6.b.**

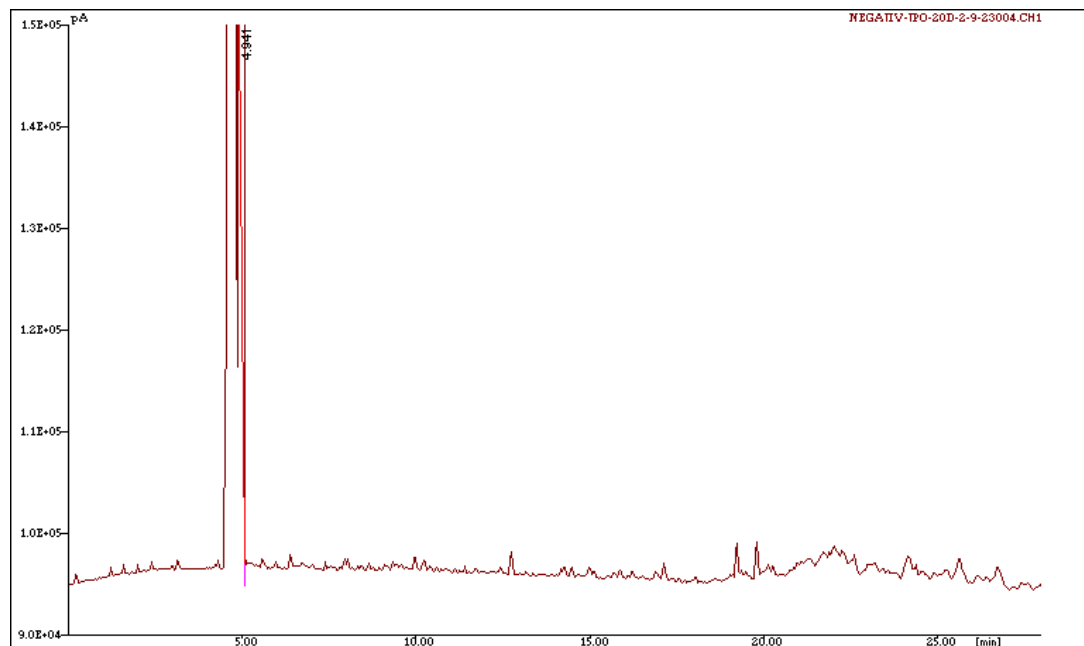
□



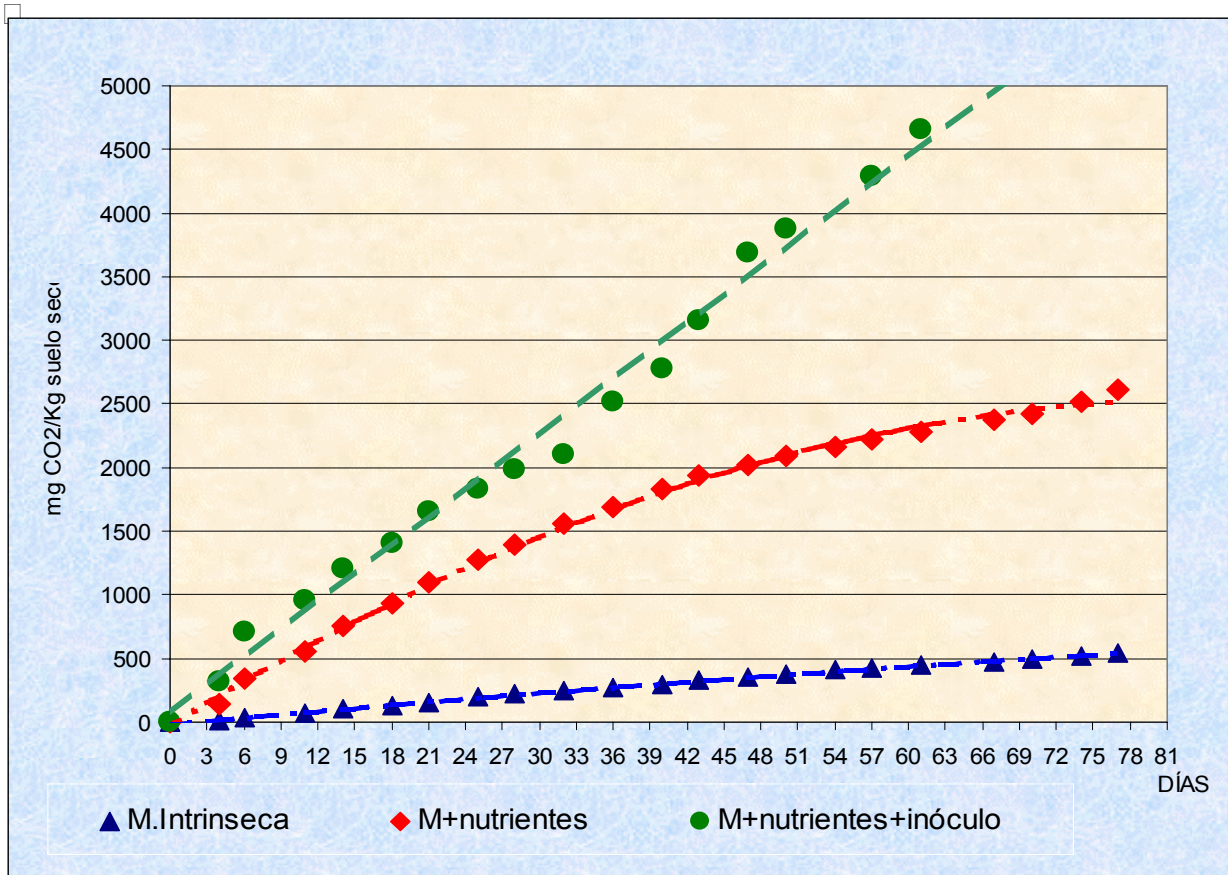
**Figura 6.c.**



**Figura 6.d.**



**Figura 7:** Cinéticas de biodegradación de hidrocarburos totales contenidos en la muestra de lavadero industrial estudiada durante 80 días. La biodegradación con nutrientes e inoculante (cepa OHP-AL-GP) tiene una excelente acción y un modelo que sigue una ecuación lineal. A todas las cinéticas se les restó la biodegradación intrínseca



### ***Estudio de la cinética de biodegradación de los hidrocarburos:***

En la figura 7 se presentan las tres curvas de los promedios de las cinéticas que corresponden a los biorreactores: intrínseco (suelo con humedad) con suelo con nutrientes y humedad, suelo con nutrientes, humedad e inoculación de cepa OHP-AL-GP. En los tres casos se les restó la escasa producción de dióxido de carbono producida en el suelo inhibido.

El seguimiento durante 77 días indica que, para el barro tratado, la opción más rápida corresponde al tratamiento con inoculación, es de hacer notar que la cantidad del inóculo fue importante, 2 ml de una densidad óptica de 0,5 unidades de absorbancia, esta biodegradación se ajusta a una ecuación poco común, lineal  $\text{CO}_2 \text{ [mg/Kg peso seco]} = 73.394 \text{ tiempo[días]} + 55.74$  [ $r^2 = 0.9889$ ], lo que indica un excelente modelo de biodegradación.

El biorreactor con suelo, humedad y nutrientes también tuvo un buen desempeño pero fue necesaria una ecuación polinómica de segundo grado para explicar su comportamiento  $\{\text{CO}_2 \text{ [mg/Kg peso seco]} = -0.3463 \{\text{tiempo[días]}\}^2 + 59.755 \{\text{tiempo[días]}\} - 24.127$   $R^2 = 0.998$ .

El biorreactor con suelo y humedad tuvo un desempeño modesto y también fue necesaria una ecuación polinómica de segundo grado para explicar su comportamiento  $\{CO_2 \text{ [mg/Kg peso seco]} = -0.0197 \{\text{tiempo[días]}\}^2 + 8.7935 \{\text{tiempo[días]}\} - 15.516 \text{ R}^2 = 0.9986\}$ .

## **Discusión**

La cepa OHP-AL-GP fue caracterizada por su perfil de metil ésteres de ácidos grasos como correspondiente al grupo de *Rhodococcus*. Su perfil de biodegradación de hidrocarburos muestra que tiene un muy buen desarrollo en aceite lubricante y gasoil un buen desarrollo en pentadecano y hexadecano y pristano, un buen desarrollo en n-octano y kerosene y un desarrollo pobre o disgónico en fenol, pentano, hexano y heptano, debemos notar que estos últimos 4 hidrocarburos tiene en general un poder toxico muy grande para las membranas biológicas. No desarrollo utilizando como única fuente de energía y carbono con los siguientes hidrocarburos: nafta, ciclohexano, ciclohexanona, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, antraceno, fenantreno, benzoato y m-toluoato. Este perfil de biodegradación es coincidente con el género *Rhodococcus*.

Existe una aparente contradicción, que no es tal, entre los resultados de las determinaciones cromatográficas en que elimina la totalidad de los hidrocarburos presentes en biorreactores líquidos incluyendo los aromáticos y el perfil de biodegradación, pero se debe tener en cuenta que el primero es una mezcla compleja y que posibilita el cometabolismo de hidrocarburos más recalcitrantes. Mientas que en el segundo ensayo se utilizan hidrocarburos puros por lo que no existe la posibilidad de ese proceso.

## **Conclusiones**

La cepa OHP-AL-GP presenta un excelente potencial de biorremediación de hidrocarburos conflictivos como son los aceites lubricantes, su posible empleo en la eliminación de barroos provenientes de lavados de motores o de estaciones de servicio sería su aplicación más importante La velocidad de degradación, en condiciones óptimas de cultivo, le confiere una ventaja adicional.

Los barroos provenientes de lavaderos industriales de camiones y equipos utilizados en la industria petrolera tienen un tratamiento biológico de muy buena performance ya sea con remediación asistida con nutrientes o a la que se agrega inoculación de cepas autóctonas, siendo este último caso que presenta una ecuación más conveniente costo/beneficio, por el bajo costo del inoculante.

## **BIBLIOGRAFÍA**

PUCCI, O.H.; BAK, M.A.; PERESSUTTI, S.R.; KLEIN, I.; HÂRTIG, C.; WÛNSCHE, L. (1998) IN SITU-SANIERUNG EINES HOCHGRADIG MIT KOHLENWASSERSTOFFEN KONTAMINIERTEN AREALS IN CERRO DRAGÓN, PATAGONIEN, ARGENTINIEN. UFZ-Bericht – Umweltforschungs-zentrum Leipzig-Halle GmbH. ISSN 0948-9452. N° 18:5-13..

PUCCI, O.H.; BAK, M.A.; PERESSUTTI, S.R.; KLEIN, L.; HÄRTIG, L.; ALVAREZ, H.M.; WÛNSCHE, L. (2000) “INFLUENCE OF CRUDE OIL CONTAMINATION ON THE BACTERIAL COMMUNITY OF SEMIARID SOILS OF PATAGONIA (ARGENTINA)”. Acta Biotechnol. 20 - 2:129-146..

RIIS, V.; BABEL, W. and PUCCI, O.H. (2002) “INFLUENCE OF HEAVY METALS ON THE MICROBIAL DEGRADATION OF DIESEL FUEL”. Chemosphere, 49:559-568. 2002.

SPEIGHT J. (1991) The chemistry and technology of petroleum. Ed Marcel Dekker. Second Edition. NY. Cap.20. Pag. 701-705.