

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud



Capacidad degradativa de cepas
***Lysinibacillus sphaericus* anteriormente**
***Bacillus sphaericus* provenientes de fondos**
de tanque petrolero

Informe final de la Práctica Profesional de la Licenciatura en
Protección y Saneamiento Ambiental

Alumna Marilina González

Prof. Asesor: Dra. Graciela Natalia Pucci

Co. Asesor: Lic. Maite Baztan

2023

Tabla de Contenidos

Resumen:	3
PALABRAS CLAVE	3
Introducción:	4
Objetivos generales:	5
Materiales y Métodos:	6
Caracterización de muestras	6
Recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos:....	Error! Bookmark not defined.
Bacterias aerobias heterotróficas.....	Error! Bookmark not defined.
Bacterias degradadoras de hidrocarburos:	Error! Bookmark not defined.
Identificación de cepas:	7
Cinéticas de utilización de ciclohexano, hexadecano, kerosene y gasoil:	7
Resultados:	7
Discusión:	17
Conclusión:	18
Bibliografía:	Error! Bookmark not defined.
Anexo I Publicación.....	24

Resumen:

En la industria petrolera se almacenan grandes cantidades de hidrocarburos en tanques, durante las etapas de extracción y procesamiento del crudo hasta su refinamiento; esto genera un residuo denominado fondo de tanque, que es una emulsión estable de sedimentos agua e hidrocarburos. El sedimento, es considerado por la legislación como residuo peligroso. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de las bacterias *Lysinibacillus sphaericus* para degradar hexadecano, ciclohexadecano, kerosene y gasoil de una muestra proveniente de fondo de tanque de la cuenca del Golfo San Jorge.

Se aislaron e identificaron cepas para determinar la cinética en distintos hidrocarburos como ciclohexadecano, hexadecano, gasoil y kerosene como fuente de carbono y energía. Se realizó un estudio bacteriológico, que consistió en recuento, aislamiento e identificación de bacterias. Se obtuvieron 15 cepas del genero *Bacillus* con gran capacidad de esporular. Todas las cepas analizadas tienen capacidad de crecimiento en medios con ciclohexadecano, hexadecano, gasoil y kerosene con una fase de adaptación que varía entre los 15 y 80 días.

PALABRAS CLAVE:

Fondo de tanque, *Lysinibacillus sphaericus*, esporular, degradación.

Introducción:

En el año 1907 se realizó la primera explotación de petróleo en Comodoro Rivadavia, Chubut, allí comenzó el progreso de la región patagónica y de esta manera se constituyó desde entonces una fuente de incalculable valor para acrecentar la economía nacional y una de las bases de su riqueza. A nivel mundial se observa una tendencia hacia las energías renovables en sus distintas variantes y presentaciones acordes a las capacidades intrínsecas de cada zona geográfica en particular. Sin embargo, según los datos del año 2011 indican que aproximadamente el 80% de la energía aún proviene de combustibles fósiles, es decir, petróleo crudo, gas natural y carbón (Quemada & González, 2011), y se espera cierta estabilidad por al menos durante los siguientes 40 años.

La cuenca del Golfo San Jorge, es la base más antigua y prolífica productora de hidrocarburos de Argentina, donde la economía regional se basa en la industria del petróleo. Muchas ciudades de la región deben su crecimiento, al fluctuante pero creciente índice económico que conlleva la extracción de petróleo crudo y su industria (Prado & Robledo, 2010).

El petróleo crudo es una mezcla compleja de cientos de fracciones de hidrocarburos, que van desde alcanos volátiles de cadena lineal hasta fracciones más pesadas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) (Adetutu et al., 2015).

Durante las distintas etapas desde su extracción hasta su refinamiento, el petróleo crudo es temporalmente almacenado en tanques, lugar donde por acción del tiempo es propenso a separarse en hidrocarburos de petróleo liviano y pesado. Los hidrocarburos más pesados se asientan junto con partículas sólidas y agua (Ayotamuno et al., 2007). Los lodos de fondo de tanque son un conjunto de agua, sedimentos, petróleo y compuestos orgánicos e inorgánicos. Estos son periódicamente removidos ya que quitan espacio de almacenamiento (Pucci et al., 2015).

Los fondos de tanque se consideran desechos peligrosos debido a la presencia de poliaromáticos y fenoles que dan su estado inflamable (González & Pucci., 2022). Varían enormemente debido a la gran diversidad de calidades existentes de petróleo crudo, las diferencias en los procesos utilizados para la separación petróleo-agua y pérdidas durante procesos industriales.

La elevada estabilidad de los lodos de fondo de tanque es atribuida a la absorción de hidrocarburos por parte de las partículas sólidas, llevando a la generación de una capa protectora o cobertora. Esta estabilidad esta magnificada por la presencia de fracciones polares como resinas y asfáltenos, que al mismo tiempo son los responsables de la alta viscosidad de los lodos. La capa protectora, como adición, crea un ambiente favorable para la corrosión microbiana y el albergue de gran cantidad y diversidad de consorcios microbianos (Lima et al., 2011).

Lysinibacillus sphaericus, es una bacteria Gram positiva que tiene la capacidad de formar estructuras especializadas llamadas endosporas, durante el proceso denominado esporulación. Las endosporas son estructuras celulares diferenciadas por su extrema resistencia al calor, las sustancias químicas agresivas y a la radiación. Sus estructuras de supervivencia permiten al microorganismo soportar condiciones de crecimiento desfavorables, entre otras temperaturas extremas, la sequedad o la carencia de nutrientes (Madigan, 2017).

En cepas nativas colombianas de *Lysinibacillus sphaericus* se determinó la tolerancia a arsénico, mercurio, cobalto, hierro y cromo, así como la bioacumulación y biosorción en biomasa activa. Es posible que las proteínas de la capa S tengan la capacidad de atrapar iones metálicos, ya sea en células vivas o muertas. Esta puede ser una alternativa para los procesos de biorremediación de metales pesados (Velásquez & Dussan, 2009).

En el presente trabajo se investigó la presencia de bacterias Gram positivas esporuladas, *Lysinibasillus sphaericus* y su capacidad de degradación de hidrocarburos, presentes en fondo de tanque de la Región del Golfo San Jorge.

Objetivos generales:

Estudiar la capacidad de las bacterias *Lysinibacillus sphaericus* para degradar hexadecano, ciclohexadecano, kerosene y gasoil.

Objetivos específicos:

- Caracterizar química y bacteriológicamente la muestra de fondo de tanque.
- Aislar las cepas de bacterias *Lysinibacillus sphaericus*.
- Identificar por ácidos grasos de membrana (FAMES) las cepas aisladas.
- Determinar la cinética de degradación de *Lysinibacillus sphaericus* en medio mineral con 1% de hexano, ciclohexano, kerosene y gasoil.

Materiales y Métodos:

Se trabajó con muestras de fondo de tanque obtenidas de distintos puntos de la cuenca del Golfo San Jorge, que se encuentran en el CEIMA (Centro de estudios e investigación de microbiología aplicada).

Caracterización de muestras: a las muestras de fondo de tanque obtenidas en la industria petrolera en la cuenca del Golfo San Jorge, se les realizó la caracterización mediante el Método de extracción de hidrocarburos totales (TPH). El contenido de TPH, se determinó sobre 30 gramos de fondo de tanque mediante una extracción con el equipo de Soxhlet, empleando hexano como solvente de extracción. Los hidrocarburos extraídos se cuantificaron gravimétricamente, tanto este como el sedimento remanente en la extracción (EPA 1664).

Análisis microbiológico de la muestra de fondo de tanque: se realizó una suspensión de 10 g de la muestra en 100 mL de solución fisiológica. Se homogeneizó durante 30 minutos en agitador orbital a 150 rpm. A partir de allí, se realizaron diluciones decimales. Los recuentos bacterianos se determinaron por la técnica de recuento de bacterias viables por diseminación en superficie incubándose 20 días a 28°C. En el método utilizado fue siembra por vertido en placa, sobre la superficie de una placa de agar se extiende, con ayuda de un asa de vidrio estéril, un volumen de un cultivo diluido (Madigan, 2017).

Se utilizó el medio R2A (g/L: extracto de levadura 0,5, peptona proteasa 0,5, casamino ácido 0,5, glucosa 0,5, almidón 0,5, piruvato de sodio 0,3, K₂HPO₄ 0,3, MgPO₄·7H₂O 0,05, agar 15, agua destilada 1000 mL) (Reasoner & Geldreich., 1985) para microorganismos aerobios totales y medio mineral MM.PGO (g/L: NaCl, K₂PO₄H 0,5, (NH₄)₂SO₄ 1,0, MgSO₄ 0,2,

KNO₃ 3, FeSO₄ 0,05, agar-agar 15, agua destilada 1000mL), suplementado con 0,1 % de una mezcla de petróleo y gasoil 1:1 para determinar el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Caracterización de cepas por la utilización de coloraciones: Las cepas que presentaron desarrollo en medio de cultivo R2A y medio mineral, se les realizó tinción de Gram y tinción de Wirtz-Conklin para determinar presencia de esporas.

Identificación de cepas: Las colonias obtenidas del recuento de bacterias, fueron aisladas en medio de cultivo nutritivo y se las identificó por la técnica de ácidos grasos de las membranas. Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar HP ultra 2 de 25 m de longitud 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 °C/min, 288 – 310 °C a 60 °C/min, 1.5 min de permanencia a 310 °C, detector por ionización de llama (Pucci & Pucci 2006). La integración de los picos se efectuó mediante HP 10.01 Chem Station, los ácidos grasos fueron identificados utilizando Sherlock 6.0 (MIDI Inc. Newark Del.) con un estándar Agilent 'Calibration standards kit for the microbial identification system'. La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico.

Cinéticas de utilización de ciclohexano, hexadecano, kerosene y gasoil:

Sobre la microbiota aislada, se utilizaron 4 compuestos de hidrocarburos como hexadecano, gasoil, ciclohexano y kerosene, se realizó la medición del aumento de la densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

La experiencia consistió en inocular 40 mL de caldo nutritivo (pluripeptona 5,0g/L y extracto de carne 3,0 g/L) con el microorganismo aislado e incorporarle 1% del hidrocarburo a estudiar (gasoil, kerosene, ciclohexano y hexadecano) incubándose a una temperatura de 28°C. Realizando lecturas diarias en el espectrofotómetro, para medir la absorbancia.

Análisis estadístico:

Para el estudio de la comunidad bacteriana se realizó un análisis cluster en base a la identificación por ácidos grasos utilizando el programa PAST (Hammer et al., 2001).

Resultados:

A través de la extracción de hidrocarburos totales del petróleo mediante Soxhlet, se determinó que el 32% correspondía al suelo (figura 1). Por cálculo entre la fracción de sedimento recuperado y el extracto de hidrocarburo se encontró que hay una parte de hidrocarburos volátiles de un 23%, mientras que el porcentaje de hidrocarburos totales del petróleo fue de 45%, la mitad de la muestra aproximadamente.

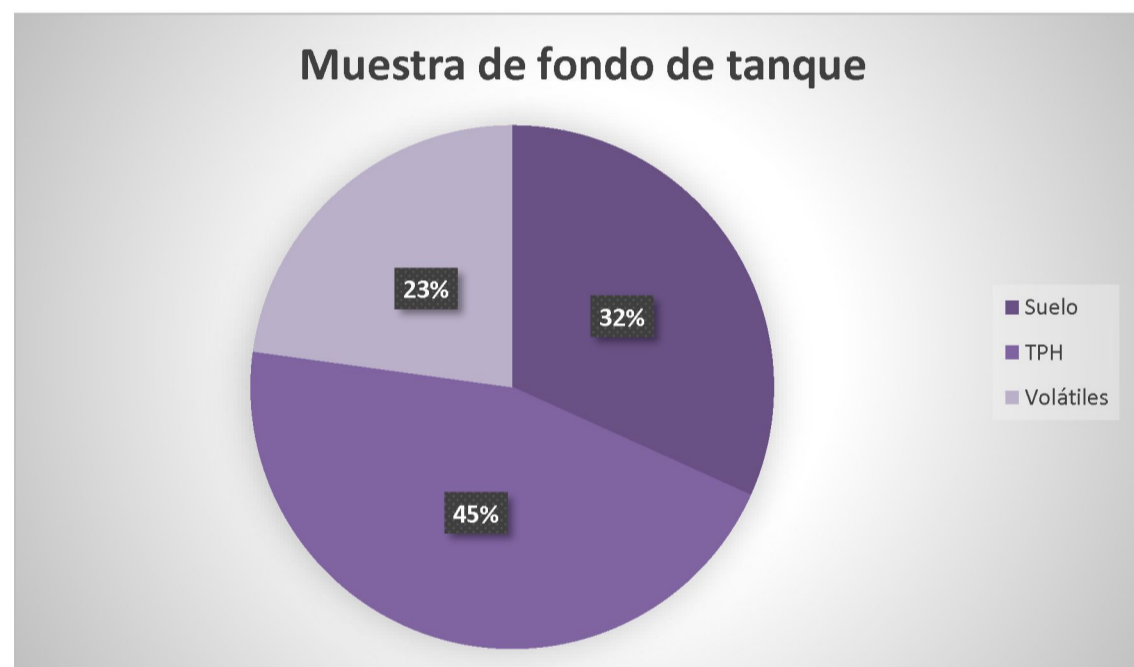


Figura 1. Composición de la muestra de fondo de tanque.

El análisis microbiológico de la muestra de fondo de tanque, se realizó a través del recuento de bacterias en medio R2A y medio mineral con suplemento de hidrocarburo. En el inicio de la experiencia, se visualizó la presencia de hongos al momento de cuantificar, lo que llevo a la utilización de un antimicótico que permita en el siguiente recuento, solo el desarrollo de bacterias. (Tabla 1).

Tabla 1. Recuento de bacterias totales y bacterias degradadoras de hidrocarburos.

	Sin antimicótico	Con antimicótico
Bacterias aerobias totales	1,0x10 ⁴ UFC/gr	9,6x10 ⁴ UFC/gr
Bacterias degradadoras de hidrocarburos	2,0x10 ⁴ UFC/gr	3,7x10 ⁴ UFC/gr

La identificación de las cepas aisladas, por el análisis ácido graso (FAMES), evidenció la presencia de *Bacillus sphaericus* obteniendo una variación entre subgrupo B y subgrupo E de las 15 cepas aisladas, las cepas C-5, C-6, C-10 pertenecen al subgrupo E y las restantes son subgrupo B (tabla 2.). En cuanto a la morfología se observó bacilos Gram positivos esporulados.

Mediante la coloración de Wirtz Conklin se pudo evidenciar la presencia de esporas en las cepas (Foto 1).

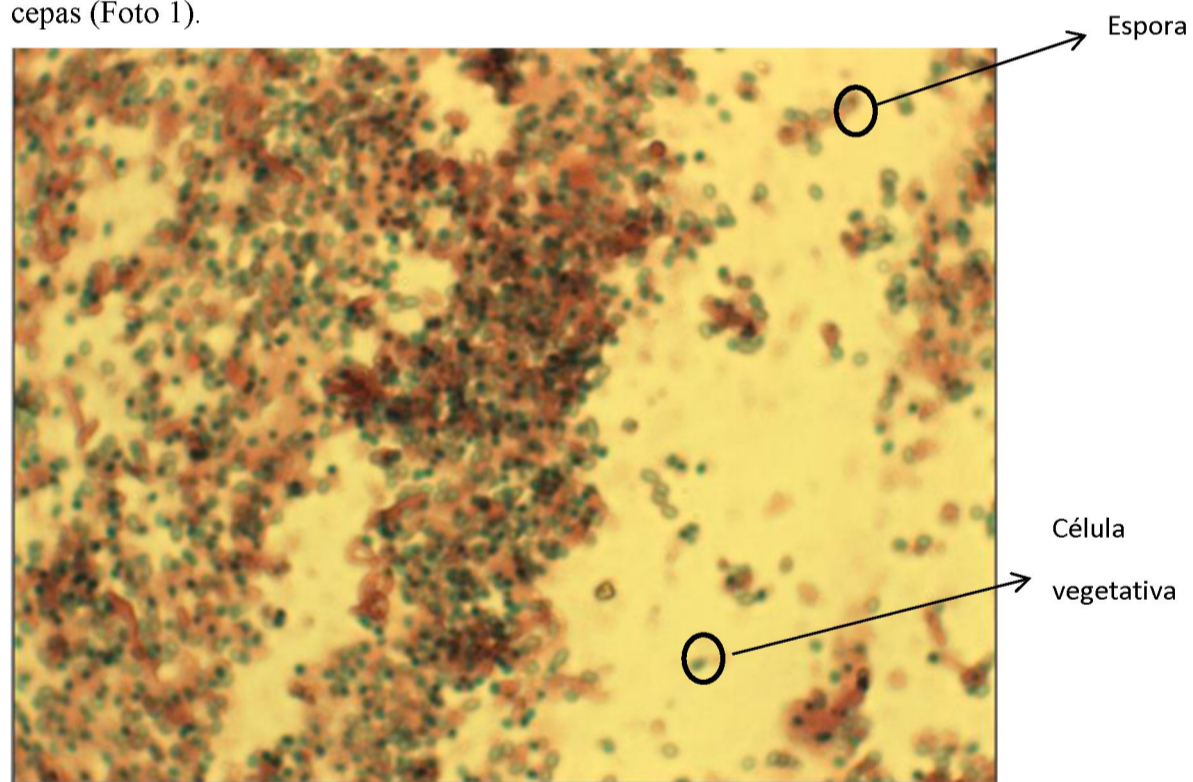


Foto 1. Cepa 7 (C-7) con presencia de esporas teñidas con la coloración de Wirtz Conklin.

Tabla 2. Identificación de cepas.

Nº de cepa	SIM INDEX	Identificación por Ácidos Grasos
C-1	0,176	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-2	0,431	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-3	0,804	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-4	0,842	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-5	0,154	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo E</i>
C-6	0,227	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo E</i>
C-7	0,827	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-8	0,742	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-9	0,823	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-10	0,672	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo E</i>
C-11	0,705	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-12	0,442	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-13	0,841	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-14	0,748	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>
C-15	0,858	<i>Bacillus sphaericus-GC subgrupo B</i>

SIM INDEX= Índice de identificación

Con el fin de confirmar la identificación preliminar asignada a cada cepa se llevó a cabo un análisis de agrupamiento. Mediante el uso de distancias euclidianas se realizó un dendrograma con el método de UPGMA, donde se puede visualizar que las cepas pertenecen todas al género *Bacillus*, obteniendo dos ramas de las especies *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B* y *subgrupo E* (Figura 2). La disposición y distancias que se observan entre las cepas trabajadas, se debe a los diferentes índices de identificación obtenidos (Tabla 2). Las cepas C-3, C-9, C-13 y C-4, todas identificadas como *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*, presentan una distancia mínima entre sí, lo que se debe a su índice de identificación superior a 0.8. En cambio, las cepas C-1 y C-6, las más alejadas en este agrupamiento, tienen un SIM INDEX menor a 0.3. El software "MIDI Sherlock Microbial Identificación System Version 6.2", identifica cepas o muestras con una similitud de 0,5 o superior; si el índice de similitud está entre 0,3 y 0,5 y está bien separado de la segunda opción (separación mayor a 0,1) puede ser una buena coincidencia; valores inferiores a 0,3 sugieren que no se encuentra la especie en la base de datos, pero aun así el software indicará las especies más emparentada.

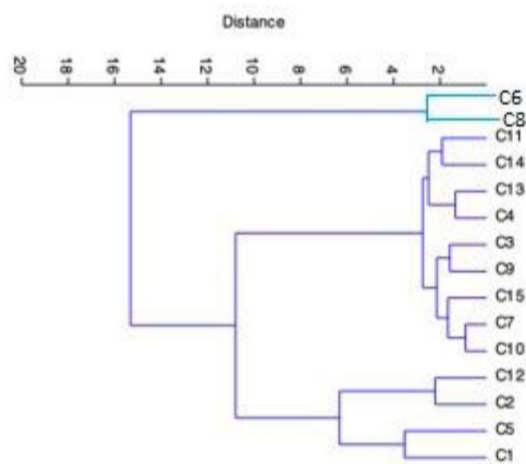


Figura 2. Análisis de agrupamiento usando el índice de distancia Eucladiana y agrupamiento UPGM de los ácidos grasos de las bacterias identificadas.

*C=identificación de cada cepa

Las cepas bacterianas identificadas fueron seleccionadas para evaluar la capacidad de degradar diferentes hidrocarburos como fuente de carbono y energía en ciclohexadecano, hexadecano, kerosene y gasoil.

Las cepas identificadas presentaron, curvas de crecimiento bacteriano similares, con una fase de latencia prolongada seguida de una fase de crecimiento exponencial y sobre el final se observó una fase estacionaria. No obstante, se observan diferencias en algunas curvas de crecimiento (figura 3 y figura 6). Principalmente en las primeras cepas, y en las dos últimas cepas.

En cuanto a las cepas C-1, C-3 y C-4, *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*, se observa en todos los casos una fase de adaptación de aproximadamente 80 días; una vez que transcurrió estas etapas de adaptación, el microorganismo comienza su crecimiento exponencial en la mayoría de los compuestos. Se visualiza que en el caso del medio con ciclohexadecano, la fase de adaptación es más lenta y en el caso de la cepa C-2 no logra visualizarse la etapa exponencial, en el tiempo que transcurrió la experiencia (figura 3).

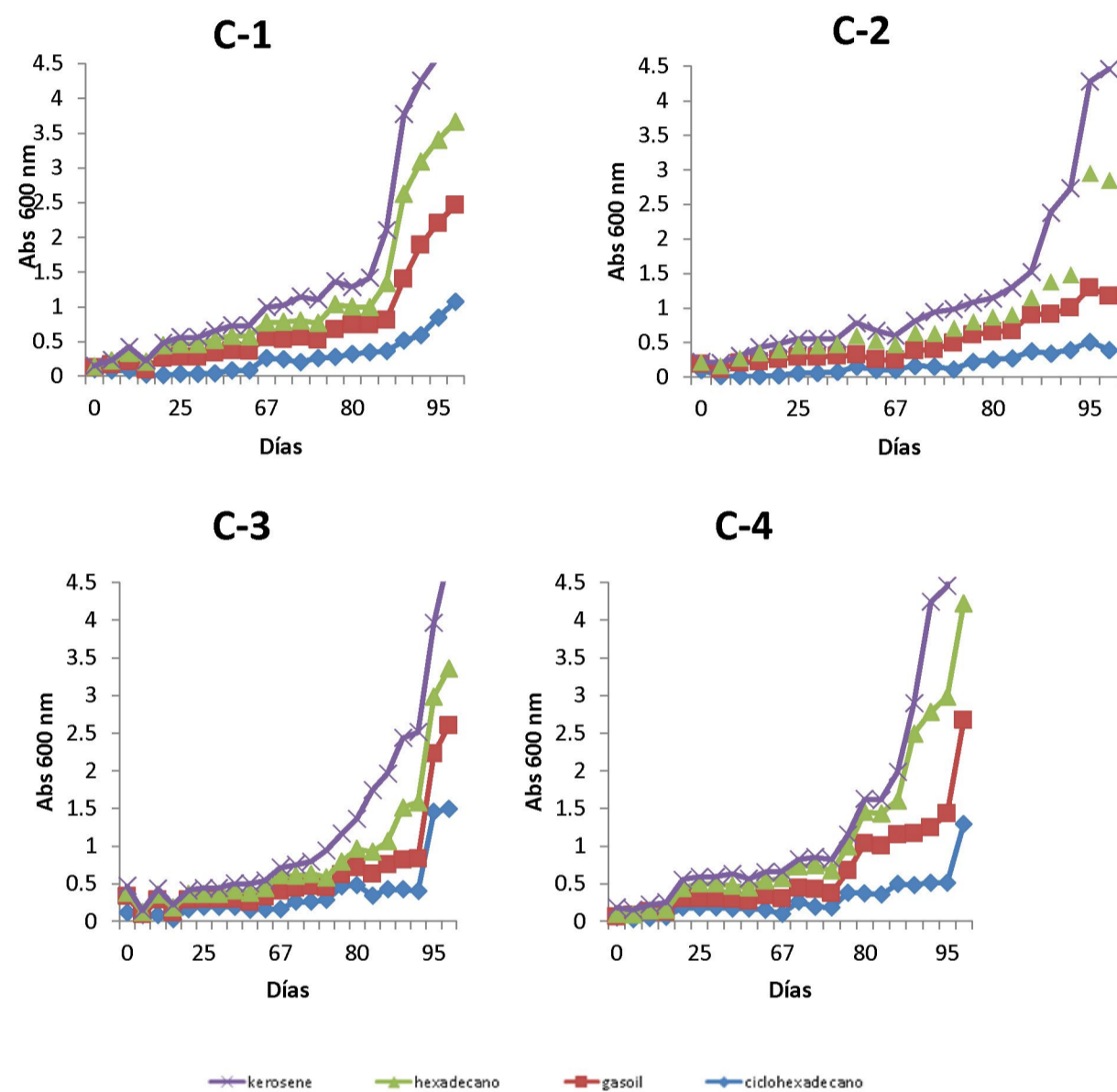


Figura 3. Curvas de crecimiento en espectrofotómetro *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*.

*Abs= Absorbancia.

Las subespecies de este género *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* y *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*, son similares en el crecimiento en los distintos medios (figura 4.). Los *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* (C-5 y C-6), específicamente en la C-5, presenta una fase de adaptación prolongada de 80 días con los cuatro hidrocarburos, un crecimiento exponencial hasta el día 95 y luego una fase estacionaria hasta el final del análisis. En la C-6 se observa que la fase de adaptación es mucho más extensa a comparación de la cepa

anterior, concretamente hasta el día 95 y se da un corto crecimiento exponencial de dos días para proseguir el estado estacionario (Figura 4.).

La cepa de *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B* (C-7) presentó una fase de adaptación más corta en el medio con kerosene, ya que pasado 75 días se observa un crecimiento exponencial. En el caso de los compuestos hexadecao y gasoil, su etapa de adaptación fue de 90 días para luego entrar en la fase exponencial, hasta terminar el análisis (Figura 4). Respecto al medio con ciclohexadecano, se observa una absorbancia menor, lo que evidencia una menor presencia de número de células. La densidad óptica o turbidez medida en cada una de las situaciones, es una medida cuantitativa de la dispersión de la luz en un medio de cultivo líquido y se incrementa cuando aumente el número de células.

La cepa C-8, presentó con los cuatro hidrocarburos el mismo desarrollo, una adaptación larga y constante hasta el día 95 aproximadamente para pasar luego a la fase exponencial. En estos medios no se logró observar la fase estacionaria en el tiempo que duro la experiencia (Figura 4.).

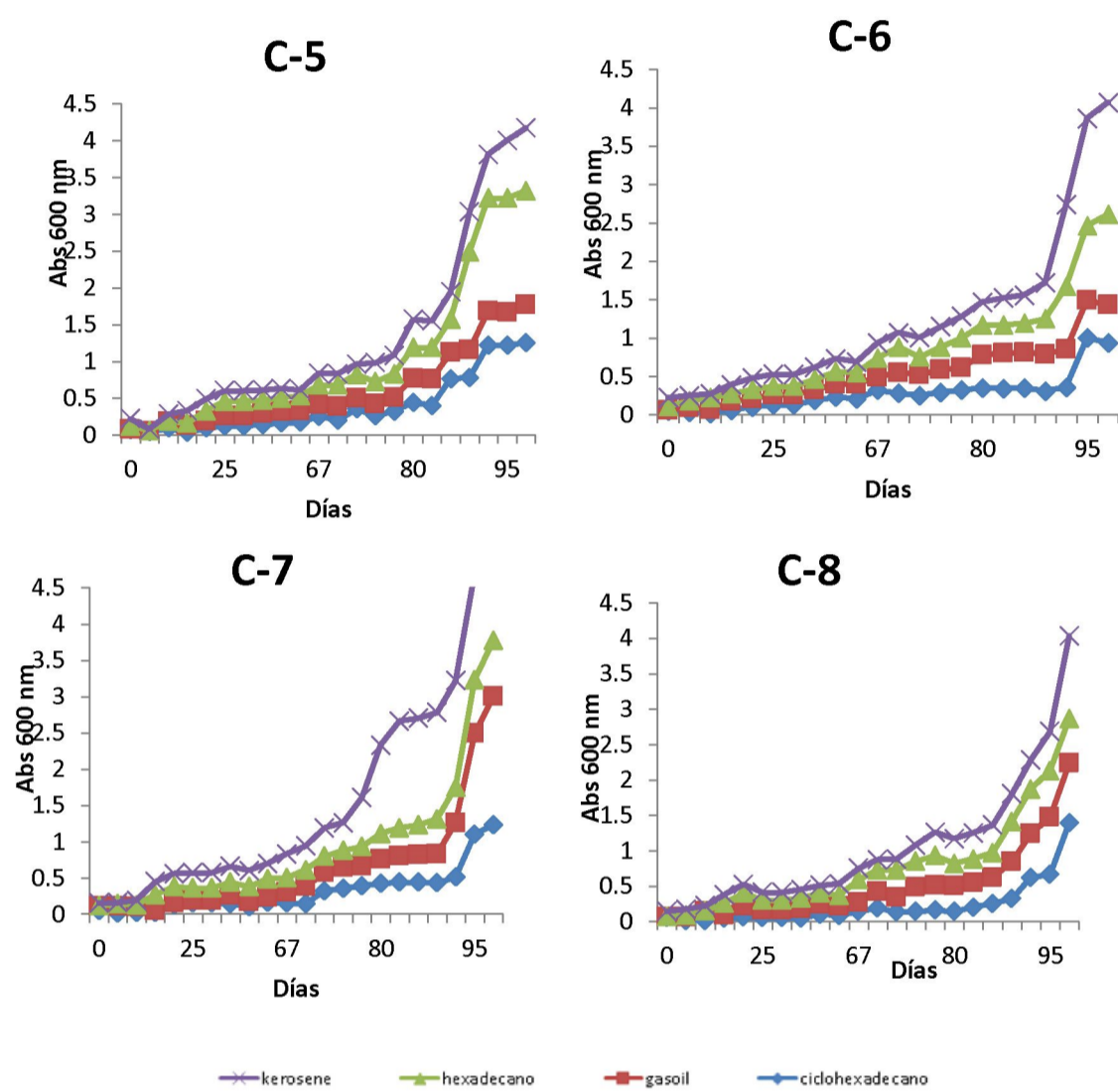


Figura 4. Curvas de crecimiento en espectrofotómetro *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* y *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*.

*Abs= Absorbancia.

En las cepas C-9, C-11 y C-12 se determinó *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*. Particularmente la cepa C-9 tiene un comportamiento similar a la cepa C-7, donde se ve un gran desarrollo de microorganismos en medio con kerosene, mientras que el ciclohexadecano presenta una larga fase de adaptación y corta fase exponencial. En cuanto a la cepa C-11, en los medios kerosene, hexadecano y gasoil exhibió una adaptabilidad rápida hasta el día 80, para continuar con la fase exponencial y una fase estacionaria corta. En cuanto a la cepa C-12 se muestra un alto grado de adaptabilidad, presentando un crecimiento constante en todos los medios. La cepa *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* (C-10) muestra una buena y rápida

adaptación a los cuatro medios presentados, luego del día 75 empieza la fase exponencial hasta llegar a la fase estacionaria (Figura 5).

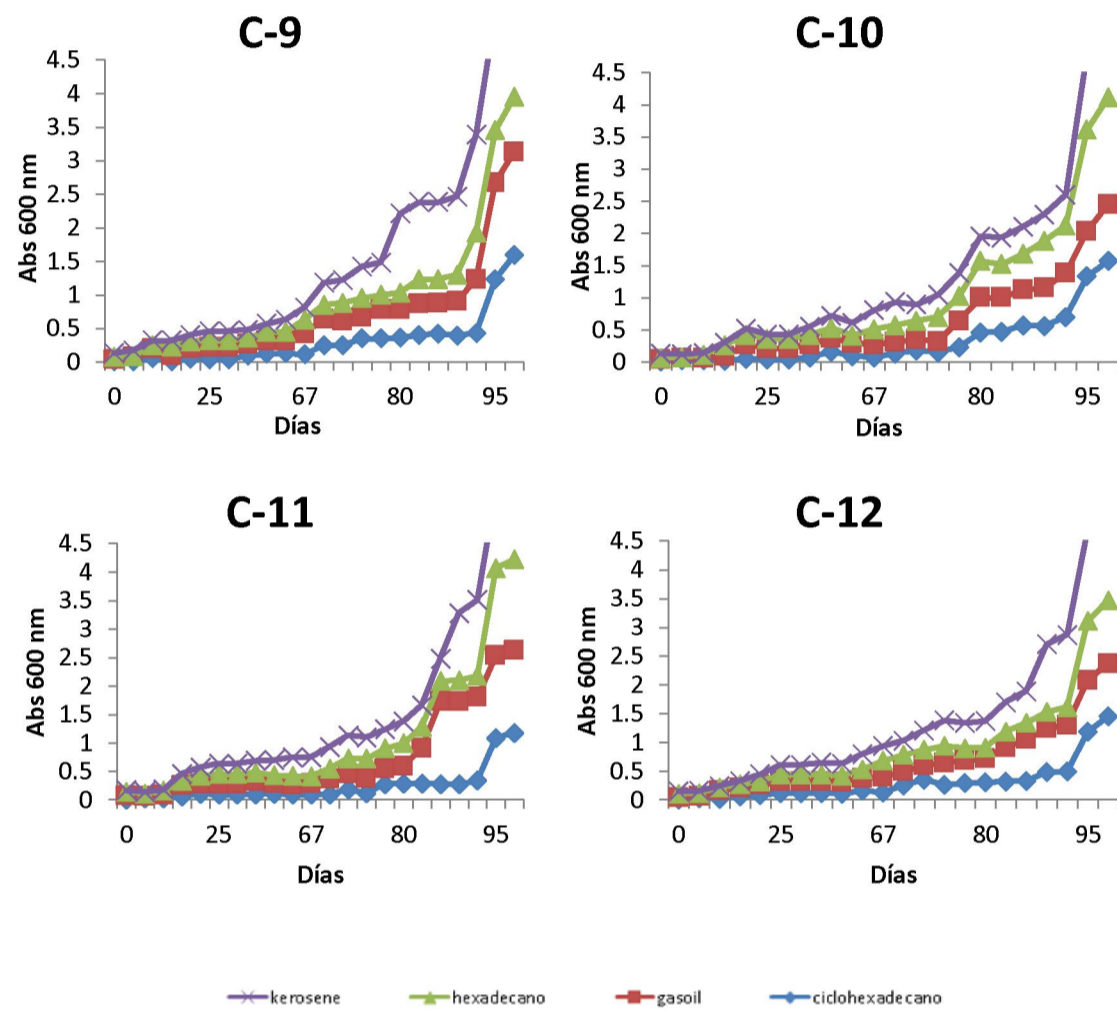


Figura 5. Curvas de crecimiento en espectrofotómetro *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* y *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*.

*Abs= Absorbancia.

En el último grupo se encuentra la cepa *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B*. La cepa C-13 presentó un mejor desarrollo en el medio que contenía kerosene como fuente de carbono y energía (Figura 6.).

La cepa C-14 presenta un crecimiento bajo en ciclohexadecano, con un crecimiento mínimo tras 95 días de análisis. En el resto de los medios tiene un comportamiento similar, observándose una fase de adaptación de 80 días y un crecimiento leve pero constante hasta el día 90 para seguir en crecimiento exponencial al finalizar el análisis (Figura 6.).

Un comportamiento similar tuvo la última cepa estudiada C-15, en donde el crecimiento fue lento y casi nulo en ciclohexadecano. En los otros medios también fue tardío el crecimiento y a los 92 días de la siembra aumentó el crecimiento celular en los medios kerosene, hexadecano y gasoil. Al momento de culminar los análisis la absorbancia seguía en ascenso en dichos medios, lo que evidencia que la cepa continuaba en crecimiento en su fase exponencial (Figura 6).

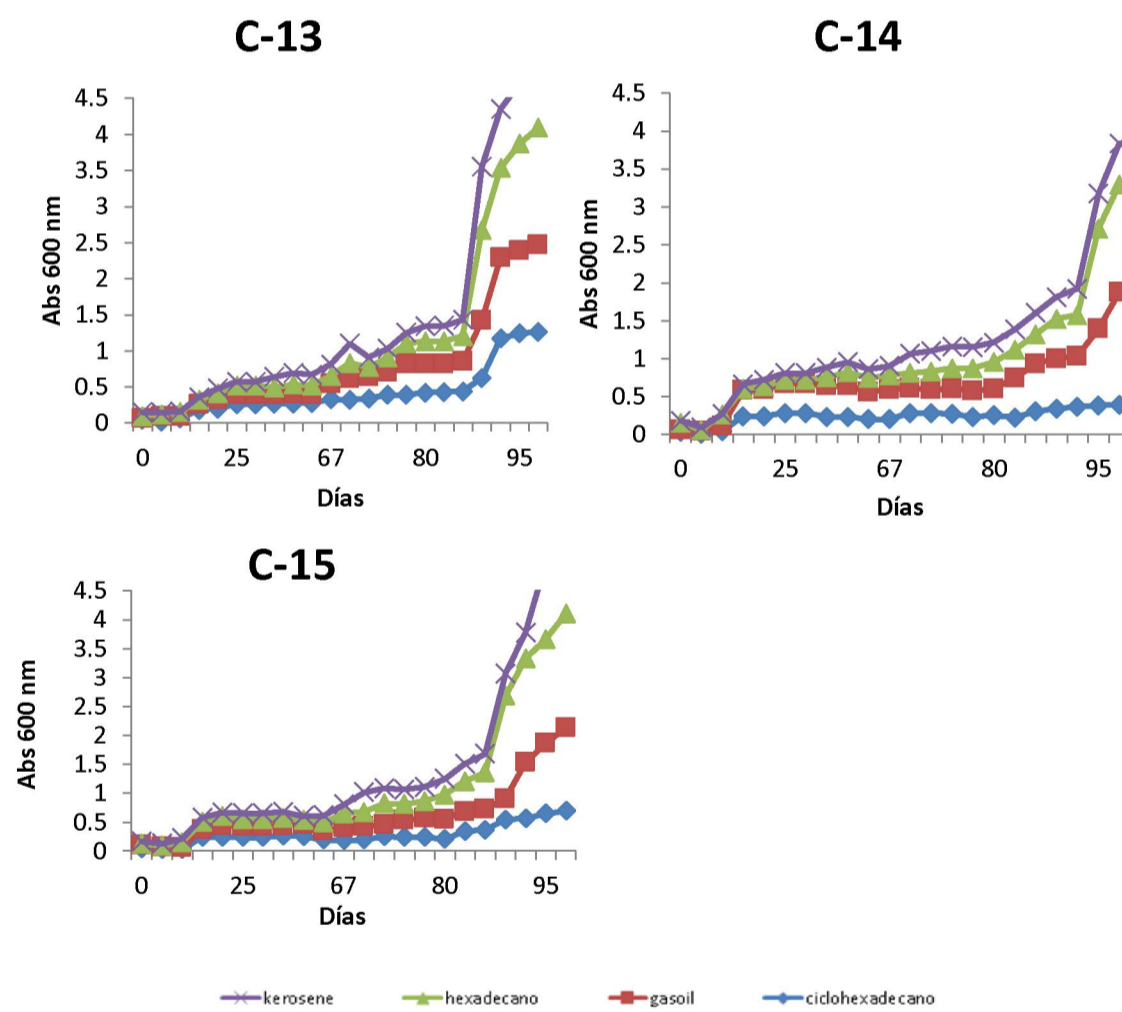


Figura 6. Curvas de crecimiento en espectrofotómetro *Bacillus sphaericus*-GC subgrupo B.

Discusión:

Los resultados obtenidos demuestran la presencia del género *Bacillus* durante las identificaciones por el ácido graso de sus membranas, donde todas las bacterias encontradas en la muestra de fondo de tanque pertenecen a este género. Este hecho condice con estudios; Ghazali et al., (2004), quien afirma que el género *Bacillus* posee una gran importancia en los procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelo, estando esto relacionado con la capacidad del género formar esporas cuando hay limitación de nutrientes en el medio y resistir en situaciones extremas. Por este motivo, en los suelos contaminados, este género es uno de los más abundantes (Ijah y Antai., 2003).

Las cepas se identificaron como *Lysinibacillus sphaericus* anteriormente llamado *Bacillus sphaericus*. Bergey., (1994) determinó que es una bacteria Gram positiva y con capacidad de esporular, degradadoras de hidrocarburos con alta resistencia a la desecación, por otro lado, Diaz-Ramírez et al, (2008) quien define que se adaptan a sistemas ecológicos con bajo contenido de nutrientes y temperaturas bajas.

Peña-Montenegro & Dussan, (2013) y Velasquez & Dussan, (2009) demostraron que *Lysinibacillus sphaericus*, se aísla en suelos y agua con potencial de remediar sitios con metales pesados como cobre, plomo, hierro y cobalto. Peña-Montenegro et al., (2015) identificó sus proteínas y determinó que puede participar en rutas metabólicas de degradación de benzoato, amino benzoato, tolueno y otros compuestos aromáticos dándole a este microorganismo capacidad de degradar hidrocarburos, esto coincide con los resultados obtenidos, en este trabajo, sobre la utilización de compuestos por parte de las cepas identificadas.

Las cepas se identificaron como *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B* y *Bacillus sphaericus.GC subgrupo E*, se observó que la fase de adaptación de todas las cepas para utilizar los 4 compuestos en estudio fue mínimo de 75 días; en el caso de la especie *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* la fase de crecimiento exponencial comienza luego de los 80 días en medio con ciclohexadecano, respecto a los medios con kerosene, gasoil y hexadecano varía entre los 90 y 95 días.

En cuanto a la especie *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B* se determinó que su fase de adaptabilidad era más larga, llegando a los 92 días en algunas cepas, estas diferencias pueden deberse a los mecanismos de crecimiento de las cepas, Leahy & Cowell, (1990) comprobaron que en la presentación de las curvas de crecimientos se puede dar por consecuencia de tres mecanismos interrelacionados: (i) inducción y/o depresión de enzimas específicas que degradan hidrocarburos; (ii) cambios genéticos que resultan en nuevas capacidades metabólicas; y (iii) enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar los hidrocarburos.

Respecto a la utilización de compuestos, se puede observar que en el caso del ciclohexadecano, fue el que menos desarrollo de microorganismo presento, quizás esto pueda deberse a que el ciclohexadecano tiene una toxicidad mayor comparado con los n-alcenos y que su estructura química es más estable por la baja tensión energética de las uniones C-C (Jaekel et al., 2015). Por otro lado, el medio con hexadecano presento un mayor crecimiento de las cepas estudiadas, lo cual puede deberse a que es de fácil degradación.

Los medios con kerosene y gasoil para las especies *Bacillus sphaericus-GC subgrupo B* y *Bacillus sphaericus-GC subgrupo E* presentan un comportamiento similar; una adaptación de 80 días, una fase exponencial de aproximadamente 10 días, seguido de una fase estacionaria que continua, se mantiene al momento de finalizar el estudio. Esto demuestra que estas bacterias tienen capacidad de tolerar las mezclas de kerosene y gasoil, crecen a costa de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía

Conclusión:

La muestra fondo de tanque, luego de someterlo a la extracción Soxhlet, determinó que un 45% es TPH, el 32% es suelo y el 23% restante corresponden a hidrocarburos volátiles.

El recuento de bacterias de la muestra de fondo de tanque expresó que hay $1,0 \times 10^4$ UFC/gr de bacterias aerobias heterótrofas, y $2,0 \times 10^4$ UFC/gr de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Se aislaron 15 cepas, en las cuales se las identifico por el análisis de ácidos grasos determinando que la totalidad de las cepas eran *Bacillus sphaericus*, 12 cepas eran *Bacillus sphaericus GC subgrupo B* y los tres restantes eran *Bacillus sphaericus GC*

subgrupo E; un género conocido por su capacidad de desarrollar en medios donde están presentes los hidrocarburos estudiados.

Las cepas aisladas son capaces de degradar compuestos de hidrocarburos propuestos, se adaptan, desarrollan y se reproducen rápidamente en presencia de kerosene, se demostró que en 13 cepas se logró la fase de adaptación y fase exponencial durante el análisis. Las cepas presentaron un comportamiento similar frente al gasoil, pero en menor medida, mientras que en hexadecano se observó solo la fase de adaptación. Por último, el ciclohexadecano presentó crecimiento casi nulo en dos cepas.

Bibliografía

- Adetutu, E.M. Bird, C. Kadali, K.K. Bueti, A. Shahsavari, E. Taha, M. Patil, S. Sheppard, P.J. Makadia, T. Simons, K.L. Ball, S.A. (2015). Exploiting the intrinsic hydrocarbon-degrading microbial capacities in oil tank bottom sludge and waste soil for sludge bioremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12: 1427–1436.
- Annweiler, E. Richnow, HH. Antranikian, G. Hebenbrock, S. Garms, C. Franke, S. Francke, W. Michaelis, W. (2000). Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene derived carbon into biomass by the thermophile bacillus therleovorans. *Applied Environmental Microbiology*, 66:518-523.
- Ayotamuno, M.J. Okparanma, R.N. Nweneka, E.K. Ogaji, S.O. Probert, S.D. (2007). Bio-remediation of a Sludge containing Hydrocarbons. *Applied Energy Journal*, 84: 936-943.
- Bergey, D.H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 96-97
- Díaz-Ramírez, I. Escalante-Espinosa, E. Favela-Torres, M. Gutiérrez-Rojas, H. (2008). Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions. Using population dynamics analysis by DGGE *International Biodeterioration*. 68(1):21-30.
- 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).

- Ghazali, FM. Rahman, RNZA. Salleh, AB. Basri, M. (2004). Degradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54(1):61-67.
- Hammer Ø Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9.
- Ijah, U & Antai, S. (2003). Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(2):93-99.
- Jaekel, U & Zedelius, J. Wilkes, H. (2015). Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments. *Frontiers in microbiology*, 6:116-120.
- Leahy, J.G & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54:305-315.
- Lima, T.M.S. Fonseca, A.F. Leão, B.A. Mounteer, A.H. Tótola, M.R. Borges, A.C. 2011. Oil Recovery from Fuel Oil Storage Tank Sludge Using Biosurfactants. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 2: 10.4172/2155-6199.1000125
- Madigan, M.T. (2017). Brock. *Biología de los microorganismos*. Ed. Prentice Hall-Pearson. Madrid. 100-102.
- Method EPA 1664. (2010). Revision B: n-Hexane Extractable Material and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water. Disponible en: <http://www.caslab.com/EPA-Method-1664>.
- Morais, EB & Tauk, T. (2009). Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a landfarming. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52(6):1571-1578.
- Penet, SR. Marchal, AC. Bertonicini, F. Monot, F. (2006). Characterisation of biodegradation capacities of environmental microflorae for diesel oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Biodegradation*. 17(6):577-585.

- Peña-Montenegro, T. Lozano, L. Dussan, G. J. (2015). Genome sequence and description of the mosquitocidal and heavy metal tolerant strain *Lysinibacillus sphaericus* CBAM5. *Standards in Genomic Sciences*. 10(1):2.
- Peña-Montenegro, T & Dussan-G, J. (2013). Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31. *Standards in Genomic Sciences*, 9: 42-56.
- Prado, M & Robledo, M. (2010). La actividad hidrocarburífera en la Cuenca del Golfo San Jorge: El papel del empresariado regional. *Revista de estudios regionales y mercado de trabajo*, 6:117-193.
- Pucci, G.N & Pucci, O.H. (2006). Cambios en los ácidos grasos de membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con diferentes temperaturas y osmolaridades. *Acta Biológica Colombiana*, 11:61-73.
- Pucci, G.N. Acuña, A. Pucci, O.H. (2015). Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanque de la industria petrolera. *Revista peruana de biología*, 22: 97-101.
- Reasoner, DJ & Geldreich, EE. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potablewater. *Appl Environ Microbiol*. 49(1):1-7.
- Quemada, J.M.M. & González, E.S.M. (2011). El futuro de los combustibles fósiles. *Economía exterior. estudios de la revista Política Exterior sobre la internacionalización de la economía española*, 58: 133-144.
- Tissot, BP & Welte, DH. (1984). *Petroleum Formation and Occurrence*. Springer-Verlag. Berlín. 31-54.
- Velásquez, L & Dussan, J. (2009). Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Revista Journal of Hazardous Materials*, 167(18) 713–716.
- Zhang, J. Xue, Q. GAO, H. Lai, H. Wang, P. (2016). Bacterial degradation of crude oil using solid formulations of *Bacillus* strains isolated from oil-contaminated soil towards microbial enhanced oil recovery application. *RSC advances*. 6(7):5566-5574.

Anexo I

Aislamientos de bacterias post tratamiento con gasoil - agua y centrifugación de fondo de tanques petroleros

Oil tank bottoms, bacteria isolate after diesel treatment - water and centrifugation

Marilina Gonzáles
ceima@unpata.edu.ar

Graciela Pucci*
<https://orcid.org/0000-0002-0238-2394>
puccigraciela@gmail.com

***Corresponding author**
Centro de Estudio e Investigación en Microbiología Aplicada, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.

Citación
Gonzales M, Pucci G. 2022. Aislamientos de bacterias post tratamiento con gasoil- agua y centrifugación de fondo de tanques petroleros. Revista peruana de biología 29(2): e21526 001- 006 (Mayo 2022). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v29i2.21526>

Presentado: 05/11/2021
Aceptado: 30/04/2022
Publicado online: 30/05/2022

Editor: Leonardo Romero

Resumen

En la industria petrolera se almacenan grandes cantidades de hidrocarburos en tanques en las diferentes etapas de extracción y procesamiento del crudo hasta su refinamiento. Esto genera un residuo denominado fondo de tanque, es una emulsión estable de sedimentos agua e hidrocarburos. Este trabajo tuvo como objeto estudiar las bacterias que están presentes en el sedimento después de la primera etapa de tratamiento con gasoil, agua, temperatura y posterior centrifugación. El sedimento, considerado por la legislación como residuo peligroso se le realizó un estudio bacteriológico, que consistió en recuento, aislamiento e identificación de bacterias. Se obtuvieron 34 cepas de las cuales 86.1% pertenecieron al género *Bacillus*. Las mismas presentaron capacidad para desarrollar en alguno de los siguientes hidrocarburos o mezclas de hidrocarburos gasoil, kerosene, hexadecano y ciclohexano.

Abstract

In the oil industry, large quantities of hydrocarbons are stored in tanks, in the different stages of extraction and processing of crude oil until it is refined. This generates a residue called a tank bottom, which is a stable emulsion of water and hydrocarbon sediments. The objective of this work was to study the bacteria that are present in the sediment after treating the bottom of the tank with diesel oil, water, and subsequent centrifugation. A bottom and tank were treated with diesel, water and centrifugation, the sediment was obtained, which was counted, isolated and bacteria were identified. 34 strains were obtained, of which 86.1% belonged to the genus *Bacillus*. The same capacity capabilities to develop diesel, kerosene, hexadecane, and cyclohexane hydrocarbons.

Palabras claves:

Fondo de tanques de petróleo; Lodo del fondo de tanque de petróleo; Contaminación; Tratamiento de desechos; Consorcios microbianos; Hidrocarburos; Tanque de almacenamiento.

Keywords:

Oil bottom tanks; Oil tank bottom sludge; Contamination; Waste treatment; Microbial consortia; Hydrocarbon; Storage tank.

Introducción

Los fondos de los tanques petroleros están conformados por petróleo, agua y sedimento. Estos se forman por un proceso de sedimentación y emulsión durante el proceso de extracción y refinamiento en la industria extractiva del petróleo. Los hidrocarburos más pesados se asientan junto con partículas sólidas y agua, formando una emulsión (Aguelmous et al. 2019). La elevada estabilidad de la emulsión en los fondos de tanque es atribuida a la absorción de hidrocarburos por parte de las partículas sólidas por su presencia de asfaltenos, resinas, sólidos finos y ácidos orgánicos solubles presentes en el petróleo

crudo (El-Batanoney 1999, Yang et al. 2009, Kralova et al. 2011, Rosen & Kunjappu 2012), que al mismo tiempo son los responsables de la alta viscosidad que estos poseen (Ayotamuno et al. 2007). El contenido de metales pesados va a depender de la cuenca de la que provenga el petróleo. Los fondos de tanques se consideran desechos peligrosos principalmente debido a la presencia de poliaromáticos y fenoles que dan su estado inflamable (Xia et al. 2006).

Estos desechos poseen una alta viscosidad, por lo que su extracción desde el fondo del tanque es difícil. Por otro lado, la composición química de los fondos de tanques afecta la presencia de bacterias, al respecto, la EPA sugiere que los procesos de biorremediación pueden llevarse a cabo en concentraciones de hidrocarburos menores a las 50000 ppm; sin embargo, este residuo posee valores más elevados (Zerna-Guzman et al. 2019). Para disminuir la cantidad de material que se almacena se realizan acciones como la reducción, la reutilización y el reciclaje (Sakai et al. 2011). Por este motivo es necesario conocer las características de los sedimentos que quedan después del proceso de lavado y si este contiene una comunidad bacteriana capaz de degradar el hidrocarburo remanente, en el caso de no disminuir la cantidad de hidrocarburos que solicitan las reglamentaciones vigentes en cada provincia petrolera. El petróleo recuperado puede reutilizarse como combustible (Shie et al. 2000) una forma es el uso de tensioactivos, sin embargo, poco se conoce del inconveniente que podrían generar los estos cuando se introducen en el sistema productivo de nuevo. Así mismo, las micro emulsiones agua/petróleo, estables son una de las fuentes más comunes de problemas operativos (por ejemplo, obstrucción) en la industria petrolera (Del Carpio et al. 2014). Además, la presencia de agua en la industria petrolera y en los fondos de tanque pueden corroer el equipo utilizado, y disminuir la gravedad API que es uno de los principales parámetros utilizados para determinar la calidad del petróleo (Del Carpio et al. 2014). La forma de romper y poder separar el agua del sedimento del petróleo es a través de la fuerza centrífuga. De hecho, es necesario pretratar los lodos de aceite de alta viscosidad con solventes orgánicos, surfactantes u otros agentes emulsionantes para reducir la viscosidad antes de la centrifugación (Cambiella et al. 2006, Zubaidy & Abouelnasr 2010).

Este trabajo tuvo como objetivo separar los sedimentos presentes en fondos de tanques con la utilización de gasoil y agua a 65°C con posterior centrifugación recuperar hidrocarburo y observar que miembros de las comunidades bacterianas quedan después del tratamiento con potencial de utilizar hidrocarburos como fuentes de carbono y energía en el sedimento.

Material y métodos

Se trabajó con fondos de tanques de la cuenca del Golfo San Jorge.

Determinación de hidrocarburos. El contenido de hidrocarburos totales (HT) se determinó sobre 50 g de suelo mediante extracción con Soxhlet durante 24 h con

hexano como solvente de extracción. Los hidrocarburos extraídos fueron cuantificados gravimétricamente. Las fracciones alifática, aromática y polar de los HT obtenidos fueron separadas por cromatografía en columna de sílica gel (Kieselgel 60, 35-70 mesh, Merck) a partir de 0.3 g de residuo. Como solventes de elución se utilizaron 250 mL de hexano, 150 mL de benceno y 150 mL de cloroformo:metanol 1:1, para los hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares, respectivamente. Las fracciones obtenidas se cuantificaron gravimétricamente.

Lavado de las muestras de fondo de tanque. Se procedió a realizar el tratamiento de limpieza de las muestras de fondos de tanque utilizando tubos torpedo de 100 mL de capacidad para observar la separación de las distintas fases de sobrenadante, agua y sedimento. El tratamiento se realizó utilizando sobre fondo de tanque con tres relaciones de gasoil y agua, (1:1.5:1.5; 1:0.75:2.25 y 1:0.5:2.5); para realizar los diferentes lavados. Se tomó en cuenta el tiempo de contacto entre el solvente y la muestra, considerando diferentes factores, tales como, tiempo de contacto, pH y temperatura de 65 °C. La centrifugación se realizó en tubos torpedos de 100 mL a 4000 rpm durante 20 minutos. Viscosidad. La viscosidad del medio de cultivo fue medida por la utilización del viscosímetro Brookfield DV-E viscometer (Brookfield) a 25 ± 1 °C con 1 minuto de rotación a diferentes velocidades utilizando spindle S00 y S01.

Recuento bacteriano. Bacterias aerobias heterotróficas: se realizó mediante el método de diseminación en superficie a partir de diluciones seriadas en solución fisiológica. El medio de cultivo utilizado fue el R2A (extracto de levadura 0.5 g/L, peptona proteasa 0.5 g/L, ácido casamino 0.5 g/L, glucosa 0.5 g/L, almidón 0.5 g/L, piruvato de sodio 0,3 g/L, fosfatos ácidos de potasio 0.3 g/L, sulfato de magnesio 0.05 g/L, agar 15 g/L) (Reasoner & Geldreich 1985). Bacterias degradadoras de hidrocarburos: se realizó mediante la técnica de diseminación en superficie en medio mineral con adición a la superficie de la placa de Petri 30 µL de una mezcla 1:1 de petróleo gasoil por placa, a una temperatura de incubación de 28 °C por 21 días (Pucci & Pucci 2003).

Aislamiento e identificación bacteriana. Las colonias obtenidas del recuento en medio mineral con petróleo y gasoil fueron aisladas en medio de cultivo nutritivo y se las identificó por la técnica de ácidos grasos de las membranas. La extracción de ácidos se realizó sobre 40 mg de bacterias comenzando con una saponificación con alcohol metílico-hidróxido de sodio-agua (150 mL: 45 g: 150 mL) seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6N y alcohol metílico (325 mL: 275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metilbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10.8 g - 900 mL) (Härtig et al. 2005). Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud, 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 °C/min, 288-310 °C a 60

°C/min, 1.5 min. de permanencia a 310 °C, detector por ionización de llama, la integración de los picos se efectuó mediante HP 10.01 ChemStation, los ácidos grasos se identificaron utilizando Sherlock (versión 6.0).

Estadística. Para el estudio de la comunidad bacteriana se realizó un análisis de correspondencia en el que se analiza la correspondencia entre cepas aisladas y los tratamientos de gasoil: agua y un análisis cluster en base a la identificación por ácidos grasos utilizando el programa PAST (Hammer et al. 2001).

Resultados

La extracción de soxhlet, con hexano presentó un fondo de tanque compuesto por 95.60% hidrocarburos, 2.81% sedimentos y un resto de sustancias volátiles de 1.79%. La composición del hidrocarburo obtenida por el método SARA fue de hidrocarburos alifáticos 47.46%, hidrocarburos aromáticos 32.2% y hidrocarburos polares 20.33%.

Luego del tratamiento con gasoil y agua, se recuperó la mayor cantidad de sedimento de las mezclas 1:1.5:1.5 (Tabla 1) la cual presentó la menor viscosidad comparada con las otras muestras. Los sedimentos obtenidos de las tres muestras mostraron valores de la misma magnitud en los recuentos bacterianos, en aerobias totales y en bacterias degradadoras de petróleo (Tabla 1). La centrifugación fue la única manera de obtener las tres fases de forma inmediata.

Tabla 1. Valores de los porcentajes recuperados y de los recuentos de bacterias aerobias totales (BAT) y degradadoras de hidrocarburos (BDH) con la utilización de las tres mezclas.

Mezcla	1:1.5:1.5	1:0.75:2.25	1:0.5:2
Viscosidad de las muestras (CP)	28.2	41.9	54.38
% de sedimento recuperado	1.89	1.25	1.13
% de agua	31.45	42.50	55.07
% HC	66.67	56.25	43.80
BAT (UFC/g)	9.8 x 10 ³	1.63 x 10 ³	7.80 x 10 ³
BDH (UFC/g)	1.04 x 10 ³	1.64 x 10 ³	7.8 x 10 ³

Las bacterias extraídas del sedimento luego del tratamiento fueron Gram positivas y en su mayoría bacterias con capacidad para esporular, también presentaron en alguna medida capacidad de desarrollar con hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Fig. 1). Los mayores valores de absorbancia se observaron en el grupo de los *Bacillus*, se graficó el promedio de los valores obtenidos por todo el grupo de *Bacillus* y su desviación estándar comparando con las bacterias Gram positivas aisladas de este grupo como son el *Staphylococcus cohnii*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus-simplex* y *Bacillus clausii*. Se lograron aislar e identificar 34 cepas las cuales son todas cepas Gram positivas y en 86.1% fueron bacilos esporulados (*Bacillus simplex* 5.6%, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus sp* 27.8%).

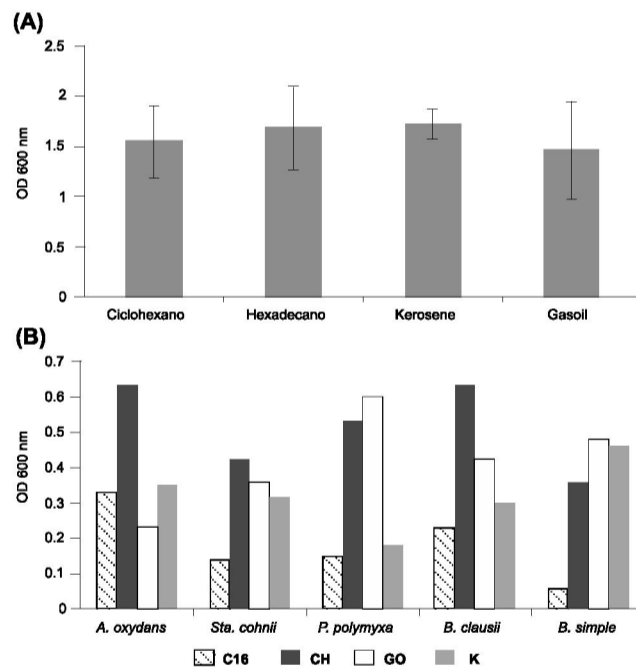


Figura 1. Valores promedios de las observancias a 600 nm para el desarrollo de los microorganismos aislados con los hidrocarburos estudiados: gasoil (GO), kerosene (K), ciclohexano (CH), hexadecano (C16).

El análisis de agrupamiento se muestra en a Figura 2, se observa un gran grupo formados por bacterias del género *Bacillus*, algunas identificadas u otras con un bajo coeficiente de similitud de identificación (Fig. 2). El *Bacillus cereus* que fue una sola cepa que se aisló de la

relación 1:0.75:2.25 (Fig 2), la relación 1:1,5:1,5 *Arthrobacter oxidans* y *Paenibacillus polymyxa*, las cepas identificadas como *Bacillus sphearicus* están en centro porque son compartidas por todas las relaciones de gasoil - agua.

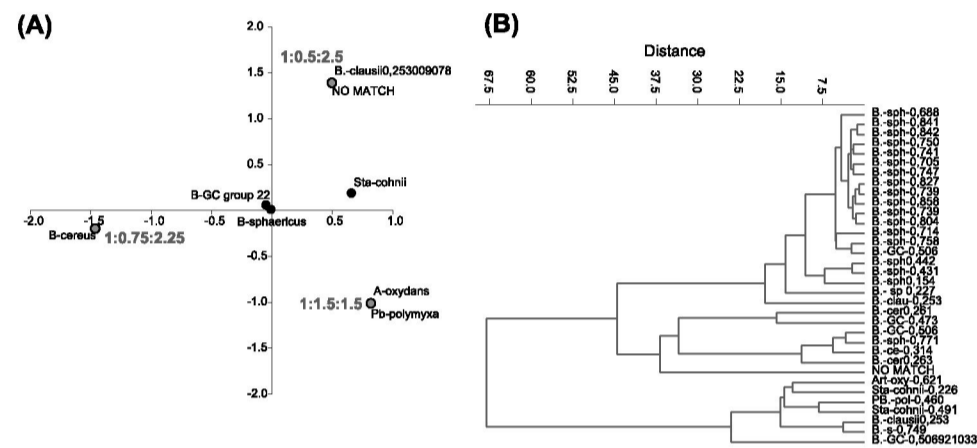


Figura 1. (A) Análisis de CA de las bacterias identificadas y de donde fueron aisladas. (B) Análisis de agrupamiento usando el índice de distancia Euclidiana y agrupamiento UPGM de los ácidos grasos de las bacterias identificadas. B-sph: *Bacillus sphaericus*, B-cer: *Bacillus cereus*; PB-pol: *Paenibacillus-polymyxa*, Sta-cohnii: *Staphilococcus cohnii*, B-clausii: *Bacillus clausii*. El número es valor de identificación obtenido.

Discusión

El agregado de gasoil, que es de fácil adquisición en el mercado, permitió tener una menor viscosidad y probablemente también es la causa de que en la centrifugación los sedimentos se separen mejor. La utilización de una temperatura de 50 °C mejoró el proceso. Esto permite la separación del sedimento la fluidez del petróleo para que vuelva al circuito. Figueroa (2009) determinó que la presencia de partículas finas aumenta significativamente la estabilidad de la emulsión, especialmente si estas son muy pequeñas por eso es importante disminuir la viscosidad para lograr una mejor separación. Zambrano-Vidal (2002) comunica que los métodos de limpieza de fondos de tanque que implican procesos de tratamientos fisicoquímicos alteran las características de los desechos peligrosos, reduciendo su concentración, toxicidad y volumen, esto es importante ya que, dependiendo del tipo de producción y extracción del pozo, los porcentajes de sedimento varían de 0.3 a 30% (Zern-Guzman et al. 2019) y Silva et al. (2012) comunica que son de 2-7%. Por otro lado, Zerna-Guzman et al. (2019) estudiando diferentes fondos de tanque y la utilización de nafta, gasoil y querosén encontraron que la concentración partículas que quedan en el petróleo baja a valores permitidos en la industria local luego de lavados utilizando gasoil.

La separación de los sedimentos baja la cantidad de material a tratar o a resguardar. Sin embargo, el sedimento todavía contiene hidrocarburos que podrían lavarse o ser tratados por procesos biológicos, por ello conocer la diversidad y capacidades bacterianas es im-

portante. En este trabajo, en el sedimento obtenido luego del tratamiento se observaron bacterias Gram positivas y la mayoría con capacidad de esporular, lo que probablemente le permitió su permanencia en el fondo de tanque cuando las concentraciones de hidrocarburos fueron de 95.60%. La biodegradación de hidrocarburos del petróleo mediante poblaciones nativas de microorganismos representa uno de los mecanismos principales a través del cual estos contaminantes pueden ser eliminados del ambiente (Morais & Tauk-Tornisiolo 2009). Pero, debe resaltarse que es importante la existencia de un consorcio bacteriano con capacidad degradación ya que los microorganismos individuales pueden metabolizar solamente un número limitado de sustancias (Gallego et al. 2007), mientras que con poblaciones mixtas se tendrían capacidades enzimáticas de amplio rango y relaciones metabólicas sinérgicas. También debe tenerse en cuenta que la producción de compuestos activos en superficie (biosurfactantes o bioemulsificantes) aumentan la bio-disponibilidad de sustratos hidrofóbicos insolubles en agua, mejorando así el crecimiento de las bacterias y la velocidad de biorremediación (Ron & Rosenberg 2002), al respecto género *Bacillus* es ampliamente mencionado en la producción de surfactantes (Heryani & Putra 2017, Felix et al. 2019).

La muestra inicial de fondo de tanque posee una cantidad de hidrocarburo que es tóxico para las membranas bacterianas, la formación de esporas permite la permanencia de estas especies hasta que las condiciones sean más propicias para su desarrollo. Ghazali et al. (2004),

afirman que el género *Bacillus* posee un rol importante en los procesos de biodegradación de hidrocarburos en el suelo, estando esto relacionado con la capacidad del género de formar esporas cuando hay limitación de nutrientes en el medio y resistir en situaciones extremas, como en el caso de *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus sphaericus* (Annweiler et al. 2000, Ijah & Antai 2003). El sistema de identificación utilizado en este trabajo es anterior al cambio taxonómico en donde se cambió el nombre de *Bacillus sphaericus* al de *Lysinibacillus sphaericus* (Logan, & Halket 2011). El género *Bacillus* es encontrado con frecuencia en suelos contaminados y posee capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Zhang et al. 2016). *Lysinibacillus sphaericus* es una bacteria con potencial de remediar sitios con metales pesados como cobre, plomo, hierro y cobalto (Velásquez & Dussan, 2009, Peña-Montenegro & Dussan 2013). Además, Peña-Montenegro et al. (2015) identificaron proteínas que pueden participar en rutas para metabolizar o metabolizar el benzoato, el amino benzoato, tolueno y otros compuestos aromáticos, lo que indica la capacidad de este microorganismo de degradar hidrocarburos. Los porcentajes de degradación de compuestos C10-C28 son superiores al 80% después de 50 días de tratamiento (Bahuguna et al. 2011, Hernández-Santana & Dussán 2018). Los microorganismos poseen diferentes enzimas catabólicas para degradar diferentes compuestos (Penet & Marchal 2006), la utilización de ciclohexano fue porque los cicloalcanos son uno de los mayores constituyentes del petróleo crudo, variando en un rango porcentual entre 20-40% del total de las fracciones de hidrocarburos (Tissot & Welte 1984). A pesar de que el ciclohexano tiene una toxicidad mayor comparado con los n-alcanos y que su estructura química más estable por la baja tensión energética de las uniones C-C (Jaekel et al. 2015), encontramos durante los ensayos cepas aisladas que pudieron utilizarlo. Por otro lado, el hexadecano es de muy fácil degradación y fue utilizado por las diferentes cepas estudiadas. Asimismo, nuestros resultados muestran que las bacterias tienen capacidad para tolerar las mezclas de kerosene y gasoil, las cuales que se acercan más a la realidad que el trabajo con hidrocarburos puros. Este trabajo muestra que el lavado del fondo de tanque con gasoil y agua (1:1.5:1.5) permitió una separación del sedimento y que este posee una población bacteriana formada principalmente por bacterias esporuladas con capacidad de utilizar hidrocarburos.

Literatura citada

- Aguelmous A, El Fels L, Souabi S, Zamama M, Hafidi M. 2019. The fate of total petroleum hydrocarbons during oily sludge composting: a critical review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 18:473-493. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09509-w>
- Annweiler E, Richnow HH, Antranikian G, Hebenbrock S, Garms C, Franke S, Francke W, Michaelis W. 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene derived carbon into biomass by the thermophile bacillus therleovorans. *Applied Environmental Microbiology*. 66:518-523. <https://doi.org/10.1128/aem.66.2.518-523.2000>
- Ayotamuno MJ, Okparanma RN, Nweneka, EK, Ogaji SOT, Probert, SD. 2007. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. *Applied Energy*. 84(9):936-943. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2007.02.007>
- Bahuguna A, Lily MK, Munjal A, Singh R.N, Dangwal K. 2011. Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*. 23(6):975-982. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60504-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60504-9)
- Cambiella A, Ortea E, Rios G, Benito JM, Pazos C, Coca J. 2006. Treatment of oil-in-water emulsions: Performance of a sawdust bed filter. *Journal of Hazardous Materials*. 131(3):195-199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.09.023>
- Del Carpio E, Rodríguez S, Rondón M, Borges B. 2014. Stability of water-Boscan crude oil emulsions: Effect of salts, alcohols and glycols. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 122:542-550. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2014.08.022>
- El-Batanoney M, Abdel-Moghny T, Ramzi M. 1999. The effect of mixed surfactants on enhancing oil recovery. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2(2):201-205. <https://doi.org/10.1007/s11743-999-0074-7>
- Felix AKN, Martins J J, Almeida JG, Giro MEA, Cavalcante KF, Melo VMM, de Santiago Aguiar RS. 2019. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 175(1):256-263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>
- Figueroa V. 2009. Desemulsificación de tanques de slop por tratamiento en frío en refinería La Pampilla. Tesis para título de Ingeniero Petroquímico. Lima-Perú: Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería de petróleo, gas natural y petroquímica. <http://cyber-tesis.uni.edu.pe/handle/uni/990>
- Gallego JL, García Martínez MJ, Llamas JF. 2007. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*. 18(3):269-281. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9061-y>
- Ghazali FM, Rahman RNZA, Salleh AB, Basri M. 2004. Degradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 54(1):61-67. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Hernández-Santana A, Dussán J. 2018. *Lysinibacillus sphaericus* proved to have potential for the remediation of petroleum hydrocarbons. *Soil and Sediment Contamination*. 27(6): 538-549. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1490888>
- Heryani H, Putra MD. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. 27(1):49-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>
- Ijah U, Antai S. 2003. Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 51(2):93-99. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00131-7)
- Jaekel U, Zedelius J, Wilkes H, Musat. 2015. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sedi-

- ments. *Frontiers in microbiology*. 6:116-120. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00116>
- Kralova J, Sjöblom J, Øye G, Simon S, Grimes BA, Paso K. 2011. Heavy Crude Oils/Particle Stabilized Emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 169(2):106-127. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.09.001>
- Logan NA, Halket G. 2011. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. In: Logan NA, Vos P, editors. *Endospore-forming Soil Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer; p. 1-29.
- Method EPA 1664. 2010. Revision B: n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water. Disponible en: <http://www.caslab.com/EPA-Method-1664/>
- Morais EB, Tauk-Tornisielo SM. 2009. Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a landfarming. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52(6):1571-1578. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000600029>
- Peña-Montenegro T, Dussan-G J. 2013. Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31. *Standards in Genomic Sciences*. 9(1):42-56. <https://doi.org/10.4056/sigs.4227894>
- Peña-Montenegro T, Lozano L, Dussan-G J. 2015. Genome sequence and description of the mosquitocidal and heavy metal tolerant strain *Lysinibacillus sphaericus* CBAM5. *Standards in Genomic Sciences*. 10(1):2. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-2>
- Penet SR, Marchal AC, Bertoncini F, Monot F. 2006. Characterisation of biodegradation capacities of environmental microflora for diesel oil by comprehensive two dimensional gas chromatography. *Biodegradation*. 17(6):577-585. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9028-4>
- Pucci GN, Pucci OH. 2003. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburo previamente sometidas a Landfarming. *Revista Argentina de Microbiología*. ISSN: 0325-7541. 35(1):62-68
- Reasoner DJ y Geldreich EE. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*. 49(1):1-7. PMID: 3883894. PMID: [PMC238333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3883894/)
- Ron EZ, Rosenberg E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion on Biotechnology*. 13(3):249-252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
- Rosen MJ, Kunjappu JT. 2012. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken, NJ, USA: Wiley: A John Wiley and Sons, Inc., Publication.
- Sakai S, Yoshida H, Hirai Y, Asari M, Takigami H, Takahashi S, Tomoda K, Peeler MV, Wejchert J, Schmid-Unterseh T, Douvan AR, Hathaway R, Hylander LD, Fischer C. Oh G. J, Jinhui L, Chi N.K. 2011. International comparative study of 3R and waste management policy developments. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 13(2):86-102. <https://doi.org/10.1007/s10163-011-0009-x>
- Shie J, Chang CY, Lin JP, Wu, CH, Lee DJ. 2000. Resources recovery of oil sludge by pyrolysis: kinetics study. *Journal of Chemical Technology. Biotechnology*. 75(6):443-450. [https://doi.org/10.1002/1097-4660\(200006\)75:6<443::AID-JCTB228>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-4660(200006)75:6<443::AID-JCTB228>3.0.CO;2-B)
- Silva RC, Carneiro GF, Barbosa LL, Lacerda V, Freitas JCC, de Castro EVR. 2012. Studies on crude oil-water biphasic mixtures by low-field NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 50(2):85-88. <https://doi.org/10.1002/mrc.2798>
- Tissot BP, Welte DH. 1984. *Petroleum Formation and Occurrence*. Berlin: Springer-Verlag.
- Velásquez L, Dussan-G J. 2009. Biosorption and Bioaccumulation of Heavy Metals on Dead and Living Biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of hazardous materials*. 167(1-3):713-6. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.044>
- Xia XH, Yu H, Yang ZF, Huang GH. 2006. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the natural waters of the Yellow River: Effects of high sediment content on biodegradation. *Chemosphere*. 65(3):457-466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.075>
- Yang X, Tan W, Bu Y. 2009. Demulsification of Asphaltenes and Resins Stabilized Emulsions via the Freeze/Thaw Method. *Energy and Fuels*. 23(1):481-486. <https://doi.org/10.1021/ef800600v>
- Zambrano Vidal ML. 2002. Tratamiento biológico de los lodos depositados en los tanques de almacenamiento de combustibles en el terminal El Beaterio. Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico. Quito-Ecuador: Escuela Politécnica Nacional. 139p.
- Zerna-Guzman M, Acuña AJ, Pucci GN. 2019. Lavado con solventes de fondos de tanques petroleros. *Asociación Ingeniería Sanitaria y Ambiental Argentina* 135(2):28-31
- Zhang J, Xue Q, Gao H, Lai H, Wang P. 2016. Bacterial degradation of crude oil using solid formulations of *Bacillus* strains isolated from oil-contaminated soil towards microbial enhanced oil recovery application. *RSC advances*. 6(7):5566-5574. <https://doi.org/10.1039/C5RA23772F>
- Zubaidy EA, Abouelnasr DM. 2010. Fuel recovery from waste oily sludge using solvent extraction. *Process Safety and Environmental Protection*. 88(5):318-326. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.04.001>

Agradecimientos / Acknowledgments:

Este trabajo fue financiado por el Centro de Investigación CEIMA, y un 10% por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Se agradece al personal no docente por la preparación de los medios de cultivo y limpieza del material, Marcos Eichel, Maite Baztán, Mirta Leiva y Miriam Robledo.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Rol de los autores / Authors Roles:

MG: Metodología, Análisis formal.

GP: Conceptualización, Metodología, Análisis formal, Investigación, Escritura-preparación del borrador original, Redacción-revisión y edición.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Financiado por el Centro de Investigación CEIMA y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Los autores declaran que no violaron u omitieron normas éticas o legales en esta investigación.

