

“Comparación de los rendimientos de biodegradación del aceite lubricante usado adsorbido en bentonita utilizando el consorcio bacteriano de microbios alimentadores de aceite (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*)”

“Comparison of the biodegradation performances of used lubricating oil adsorbed on bentonite using the bacterial consortium of oil-feeding microbes (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Bacillus*)”

Jaqueline Heidy Chirre-Flores, Master¹, Roberto Robles-Calderón, Master²

¹Universidad Privada del Norte, Lima-Perú, jaqueline.chirre@upn.pe, ²Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, roblesc1@unmsm.edu.pe

Resumen.- El planeta está siendo afectada por la contaminación ambiental por residuos del petróleo como los aceites lubricantes usados, que se originan por el aceite lubricante de diversas marcas comerciales que utilizan los vehículos, máquinas industriales, entre otros, que al ser utilizados pierden sus características físicas y químicas que causan contaminantes en su composición como azufre, metales pesados, agua, etc. En el presente estudio se evaluará el rendimiento de la biodegradación del aceite lubricante utilizado, empleando el consorcio bacteriano Oil Eating Microbes (OEM) conformado por tres bacterias (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*), la que cuantificó el porcentaje de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo contenidas en la arcilla bentonita Tonsil 166, el resultado óptimo de dos pruebas experimentales fue de un porcentaje de biodegradación de 57 %, a temperatura de 35 °C, pH 7,0; con agitación mecánica de 120 RPM y una dilución de la arcilla contaminada con aceite lubricante usado en agua de 1(arcilla):3(agua).

Palabras claves-- Aceites lubricantes usados, biodegradación aeróbica, absorción, dilución, arcilla bentonita.

Abstract.- The planet is being affected by environmental contamination due to petroleum residues such as used lubricating oils, which originate from the lubricating oil of various commercial brands used by vehicles, industrial machines, among others, which lose their properties when used. physical and chemical characteristics that cause pollutants in its composition such as sulfur, heavy metals, water, etc. In the present study, the biodegradation performance of the lubricating oil used will be evaluated, using the Oil Eating Microbes (OEM) bacterial consortium made up of three bacteria (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Bacillus*), which quantified the biodegradation percentage of total petroleum hydrocarbons. contained in the Tonsil 166 bentonite clay, the optimal result of two experimental tests was a biodegradation percentage of 57 %, at a temperature of 35 °C, pH 7.0; with mechanical agitation of 120 RPM and a dilution of the contaminated clay with used lubricating oil in water of 1(clay):3(water).

Keywords-- Used lubricating oils, aerobic biodegradation, absorption, dilution, bentonite clay.

I. INTRODUCTION

Los combustibles fósiles producen diferentes formas de energía, pero también son residuos peligrosos que causan la contaminación al medio ambiente (suelo, aire, agua), así como sus derivados como el aceite lubricante automotriz, que después de ser utilizado causa compuestos perjudiciales o tóxicos como metales pesados, agua, hidrocarburos poliaromáticos, generando la oxidación y corrosión de las mismas maquinarias. Para reducir el impacto ambiental que causan estos contaminantes se han practicado diversas técnicas de tratamiento, uno de ellos es el proceso de biorremediación y biodegradación de estos contaminantes utilizando consorcios bacterianos.

La biorremediación de suelos contaminados es una técnica de tratamiento que tiene como objetivo utilizar el potencial de la microbiota autóctona o exógena, para degradar los compuestos orgánicos constituyentes de los residuos, con la consecuente disminución de la toxicidad. Esta tecnología está influenciada por factores internos y externos. Entre los factores internos se destaca el genotipo de los microorganismos y entre los externos, la temperatura, la aireación, el tipo y la concentración de los contaminantes, su grado de intemperismo, así como las fuentes y las concentraciones de los macronutrientes [3].

Debido al impacto ambiental negativo de los hidrocarburos de petróleo, se han desarrollado técnicas para su eliminación, entre los que se consideran la extracción de hidrocarburos por vacío, lavado del suelo contaminado con agua, incineración, recuperación electrocinética, entre otras. Con estas técnicas se consiguen resultados positivos; pero su

elevado costo económico, es un obstáculo para su empleo. En este contexto, la biorremediación, es una alternativa viable para disminuir el deterioro de la calidad del suelo por el derrame de petróleo [1].

En Colombia, la explotación petrolera y todos los procesos relacionados con esta actividad han generado un incremento en la contaminación por vertimiento de petróleo y la disposición de residuos en los ecosistemas. La presencia de TPHs (Hidrocarburos Totales de Petróleo) representa graves problemas ambientales para los ecosistemas y problemas económicos para las compañías. Por esta razón, es necesaria la búsqueda y aplicación de procesos como la biorremediación, la cual proporciona una solución ambientalmente segura, efectiva y viable económicamente para la remediación de suelos contaminados con petróleo. El objetivo principal de la biorremediación es acelerar la degradación total o parcial del contaminante orgánico disminuyendo su toxicidad, movilidad e impacto ambiental [2].

Existen más de 100 especies de bacterias, distribuidas en 30 géneros microbianos, capaces de usar los hidrocarburos como fuente de carbono para sus funciones metabólicas, siendo los géneros más conocidos, con capacidad biodegradadora: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, *Micrococcus*, *Mucor*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* [6].

Un artículo correspondiente al estudio de las características de degradación de aceites lubricantes usados sobre diversos nutrientes se publicó, al final del experimento (después 105 días), el nivel de contaminación se redujo de $9320 \pm 343 \text{ mg kg}^{-1}$ a $4576 - 5393 \text{ mg/kg}^{-1}$, que representa entre el 42 % y 51 % en rendimiento en suelo fertilizado, mientras que solo el 18 % del hidrocarburo fue eliminado en el suelo no fertilizado. El efecto de la bioestimulación de los microorganismos nativos del suelo disminuyó con el tiempo en 42 % de la concentración inicial de hidrocarburos [4].

Se publicó un artículo que estudió el rendimiento de las bacterias para biodegradar compuestos aceitosos. Los autores encontraron que estas bacterias presentaban una mejor capacidad para biodegradar aceites, en un rango de pH de 4.5 a 9.5, a una temperatura recomendable de 20 °C a 25 °C, lo que dio como resultado una degradación del 73 % y un 60 % a 30 °C; sin embargo, a una temperatura de 42 °C y menos de 15 °C, los rendimientos disminuyeron (35 % y 45 %, respectivamente) [6].

El objetivo de la investigación fue realizar la comparación de los resultados de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo contenidas en el aceite lubricante usado, a diferentes condiciones de operación del proceso de biorremediación.

II. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, en la modalidad experimental de tipo exploratoria. A continuación se menciona los materiales, equipos y aditivos utilizados en las pruebas experimentales: consorcio bacteriano O.E.M. (Oil Eating Microbes) de la patente Edvotek (USA), que está conformado por tres bacterias (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Bacillus*), un biorreactor de acero inoxidable de capacidad de 5L proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con sistemas de control de temperatura mediante una termocupla de 1500 Watts conectado a un tablero de control, aireación mediante un compresor, agitación con motor de ¼ HP de potencia nominal.

El biorreactor tiene entradas de sensores para medición de CO₂, así como para la extracción de muestras para las respectivas mediciones de hidrocarburos totales, análisis fisicoquímicos, mediante el equipo de Soxhlet de acuerdo a la técnica 3540 de la EPA (Environmental Protection Agency).

Caracterización del Aceite Lubricante Usado (Castrol Magnatec 10W40 SN)

Las características fisicoquímicas del aceite lubricante automotriz usado, se observa en la tabla 1:

Tabla 1

Características del aceite lubricante usado (Castrol Magnatec 10W40 SN).

Características del aceite usado	Métodos	Aceite automotor
Viscosidad a 100°C, cSt	ASTM D7279	12.85
Oxidación, A/cm	ASTM E2412	3.56
Nitración, A/cm	ASTM E2412	14.57
Sulfatación, A/cm	ASTM E2412	9.51
TBN, mgKOH/g	ASTM D2896	3.29
Hollin, A/cm	ASTM E2412	4.61
Agua, %	ASTM E2412	0.01
Glicol, %	ASTM E2412	0
Diluyente, % peso	ASTM E2412	0.5
Silicio, ppm	ASTM D6595	9
Sodio, ppm	ASTM D6595	26
Aluminio, ppm	ASTM D6595	5
Cobre, ppm	ASTM D6595	1
Cromo, ppm	ASTM D6595	0
Hierro, ppm	ASTM D6595	28
Plomo, ppm	ASTM D6595	0
Estaño, ppm	ASTM D6595	0
Níquel, ppm	ASTM D6595	0
Cadmio, ppm	ASTM D6595	0
Vanadio, ppm	ASTM D6595	1
Plata, ppm	ASTM D6595	0
Calcio, ppm	ASTM D6595	1417
Fósforo, ppm	ASTM D6595	500
Zinc, ppm	ASTM D6595	535
Magnesio, ppm	ASTM D6595	7
Boro, ppm	ASTM D6595	14
Bario, ppm	ASTM D6595	1
Titanio, ppm	ASTM D6595	1
Molibdeno, ppm	ASTM D6595	45
Manganeso, ppm	ASTM D6595	76

Fuente: Elaboración Propia.

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).

ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

DO NOT REMOVE

Caracterización de la Arcilla Bentonita

La arcilla bentonita utilizada es el Tonsil 166, cálcica, proveniente del centro del Perú en la tabla 2 se presenta sus características.

Tabla 2
Características de la arcilla bentonita

Características	Especificación	Resultados
Acidez residual	-0,80	0,64 %
Humedad	-1,8	15,6 %
Malla +20	-50	26 %
pH al 10 %	3 - 4	3
Densidad aparente (g/cc)	400 - 500	492

Fuente: Elaboración Propia.

Evaluación de la actividad oleofílica por cepa según Mills y Col., 1978.

Con el consorcio separado se procedió a reactivar a cada una de las cepas en tubos con 5 mL de medio TSB y se dejó en incubación por 24 horas a 35°C (figura 4). Luego se tomó 2 mL del medio de cultivo en eppendorf y se centrifugó a 14500 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2 mL de solución salina (0.85%), el lavado y homogeneizado se realizó 2 veces para cada cepa. Finalmente, se resuspendió cada cepa en 3 tubos con Medio Mineral Millis; cada tubo tenía un volumen final de 10 mL, pero el volumen de inóculo fue de 0.1 mL, 0.5 mL y 1 mL con unas gotas de aceite lubricante usado, estos tubos se dejaron 14 días a temperatura ambiente (figura 1, 2 y 3).



Fig. 1: Muestra tubos en medio Millis con *Rhodococcus pyridinivorans*



Fig. 2: Muestra tubos en medio Millis con *Pseudomonas montielli*



Fig. 3: Muestra tubos con medio Millis con *Bacillus licheniformis*



Fig. 4: Muestra de tubos con el consorcio liofilizado.

Identificación de los Componentes del Consorcio

El consorcio bacteriano está conformado por: *Rhodococcus Pyridinivorans*, *Pseudomonas montiellii* y *Bacillus Licheniformis*.

La actividad oleofílica de los microorganismos aislados se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Mills et al. (1978). Para ello, las bacterias del consorcio se reactivaron por separado en tubos con 5 mL conteniendo medio TSB y se incubaron durante 24 horas a 35 °C. Seguidamente, se tomó 2 mL de la suspensión celular en un tubo eppendorf y se centrifugó a 14 500 rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2 mL de solución salina (0.85 %). Se lavó y homogeneizó dos veces para cada cepa. Finalmente, cada cepa en volúmenes de 0.1 mL, 0.5 mL y 1 mL se inocularon por separado en tres tubos de ensayo de 10 mL conteniendo medio Mineral Mills y 0.05 mL de ALU. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 14 días.

Cultivo en matraces

El cultivo de microorganismos se realizó de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se agregó 3 mL de medio TSB estéril y 1 mL del respectivo inóculo y se dejó reposar aproximadamente durante 8 horas; luego, se midió el crecimiento de la biomasa en un equipo espectrofotómetro. A continuación, en un matraz se añadió 3 mL del inóculo anterior y se dejó en reposo durante 2 horas y luego, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro. Seguidamente, en un matraz de 300 mL, se añadió los 30 mL de la solución anterior y se dejó en reposo durante 1 hora; luego, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro. La absorbancia se midió a 620 nm. Adicionalmente se determinó la biomasa por gravimetría.

Características del Consorcio liofilizado

- Rhodococcus Pyridinivorans*:**

En la figura 5 se muestra la curva de crecimiento de la bacteria *Rhodococcus pyridinivorans*, de 0 a 15 horas, éstas colonias presentaron un diámetro de 0.4 cm a las 24 horas, vistas en el microscopio electrónico.

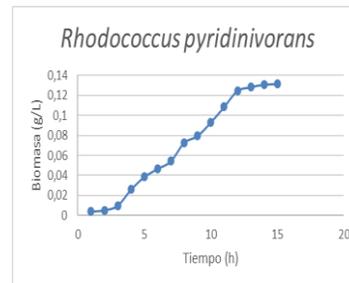


Fig. 5. Comportamiento de Bacteria *Rhodococcus Pyridinivorans* y vista en el microscopio electrónico.

Pseudomonas Montielli:

En la figura 6 se muestra la curva de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas monteillii*, desde las 9 am hasta las 21 horas, las colonias de esta bacteria son de forma circular de 0.25 cm de diámetro, vistas en el microscopio electrónico.

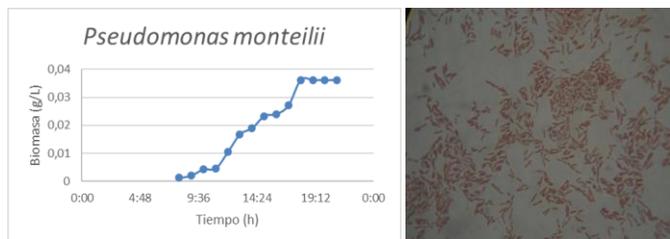


Fig. 6. Comportamiento de Bacteria *Pseudomonas Montielli* y vista en el microscopio.

Bacillus licheniformis

En la figura 7 se muestra la curva de crecimiento de la bacteria *Bacillus licheniformis* desde las 8 am a 21 horas, estas colonias son irregulares y miden aproximadamente 0.6 cm de diámetro, vistas en el microscopio electrónico.

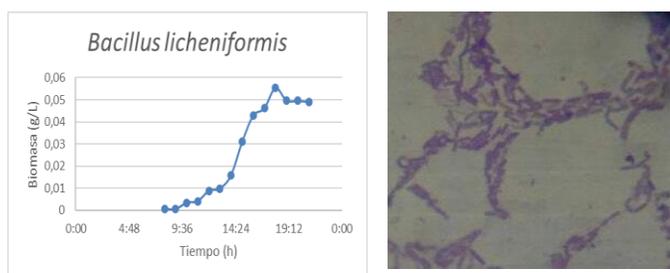


Fig. 7. Comportamiento de Bacteria *Bacillus Licheniformis* y vista en el microscopio.

Procedimiento Experimental de Biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo utilizando el consorcio bacteriano en la arcilla bentonita contaminada con aceite lubricante usado

Inicialmente se colocó en el biorreactor 2 Kilogramos de arcilla bentonita contaminada con aceite lubricante usado, se agregó 2 litros de agua potable, se añadió 200 mL de solución de soda cáustica para neutralizar la mezcla a pH 7 y finalmente se agregó el cultivo de microorganismos y se cerró el biorreactor con sus respectivos accesorios.

Durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo, retirándose muestras cada período de

tiempo para la medición de crecimiento microbiano e hidrocarburos totales de petróleo.

Las dos pruebas experimentales se desarrollaron en el biorreactor de 5 L (figura 8), durante períodos de 13 días y 58 días, con dilución arcilla:agua de 1:1 y 1:3, respectivamente, concentración inicial de consorcio de 10% y 20%. En la prueba experimental con periodo de duración de 58 días, se obtuvo el mejor resultado de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (57,69 %), a dilución arcilla en agua de 1:3, en la que hay una buena difusión del hidrocarburo en el medio, una completa homogeneización y aireación de la mezcla, produciendo una buena transferencia de masa en el sistema.



Fig. 8. Reactor biológico de 5 L en acero inoxidable.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la actividad oleofílica del consorcio en un aceite lubricante usado fue óptimo, porque se logró aclarar el aceite usado y eliminar sus contaminantes.

El proceso de biodegradación se desarrolló a pH neutro, a temperatura entre 30°C y 35 °C, agitación de la mezcla a 120 rpm, con una aireación de 1.5 vvm.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 3.

Lectura del porcentaje de degradación máxima de HTP (%).

Prueba	Relación Arcilla:agua	C _i del consorcio bacteriano	% de degradación máxima de HTP
1	1:1	10 %	1,8
2	1:3	20 %	57,69

Se observa una gran diferencia en el porcentaje de degradación de hidrocarburos totales de petróleo entre las pruebas realizadas durante 13 días y 58 días, en la que la segunda prueba experimental rinde mayor biodegradación y biorremediación de los contaminantes de la arcilla bentonita (1,8 % y 57,69 %, respectivamente).

La actividad del consorcio bacteriano depende de las condiciones de operación a la que están expuestas y a la biodisponibilidad de materia orgánica del medio agua y arcilla contaminada.

En la evaluación de la actividad oleofílica del consorcio bacteriano se obtuvieron resultados óptimos lográndose aclarar el aceite usado, así como la eliminación de sus contaminantes.

IV. CONCLUSIONES

Mediante el aislamiento de las bacterias que conforman el consorcio Oil Eating Microbes (OEM), se determinó experimentalmente que cada una de ellas tienen actividades oleofílicas.

Se comprobó experimentalmente que la dilución arcilla:agua, es una variable importante en el proceso, ya que favorece la mayor movilidad de las bacterias aumentando significativamente el porcentaje de biodegradación del aceite lubricante usado (relación arcilla:agua de 1:3).

La concentración inicial de bacterias en el proceso afecta favorablemente el porcentaje de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo.

Se recomienda investigar otras variables del proceso, para obtener nuevos resultados experimentales de biodegradación de los contaminantes presentes en la arcilla bentonita.

Asimismo, se recomienda trabajar con otras cepas bacterianas con propiedades de biorremediación de contaminantes hidrocarbonados para mejorar el rendimiento del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima-Perú y a la Facultad de Petróleo, Gas Natural y Petroquímica de la Universidad Nacional de Ingeniería-Lima-Perú.

REFERENCIAS

[1] Cabanillas, J., y Pissani, V. (2015). Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. (Tesis de licenciatura) . Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

[2] Dua, M.; Sing, A.; Sethunathan.; Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations (Mini-review). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:143-152.

[3] Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R. y Grenberg B.M. (2004). Responses of three grass species to cresote during phytoremediation. *Environ Pollut*. 130, 453-464.

[4] Lee, S. H., Lee, S., Kim, D. Y., y Kim, J. G. (2006). *Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions*. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.059>. Recuperado el 02 de marzo del 2018 de https://www.researchgate.net/publication/6765257_Degradation_Characteristics_of_Waste_Lubricants_Under_Different_Nutrient_Conditions

[5] Tano-Debrah, K., Fukuyama. S., Otonari. N., Taniguchi. F., y Ogura, M. (2002). An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils. *Bioresourse Technology*, 69(2), 133-139.

[6] Vizuete, R. (2011). Determinación de la capacidad biodegradadora de hidrocarburos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. Proyecto de Trabajo de Graduación, modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato, Ecuador, 192 PP.