

Sistema de tratamiento de residuos de destilación primaria usando consorcios microbianos

Waste treatment system primary distillation using microbial consortia

Woolcott J.C; Palomino, R.A; Gómez, H; Anaya, F; Loayza, J.E; Cornejo, O.; Erazo, R.

RESUMEN

En el presente estudio reportamos el tratamiento biológico de los residuos generados en la destilación primaria de petróleo crudo, usando un consorcio microbiano y una cepa de *Pseudomonas stutzeri*. La muestra de este estudio fue el residual de la refinería La Pampilla, que fue donada por la empresa Repsol en virtud de nuestra solicitud. De hecho, fue posible fluidizar el residual por medio de la acción del consorcio bacteriano y una cepa de *Pseudomonas stutzeri*. El proceso puede ser explicado como un bio craqueo de los residuos pesados que tienen lugar a temperatura ambiente. Antes de este proceso se procedió a la propagación del consorcio microbiano sobre el sustrato (residual) para servir como inóculo en la fase de enriquecimiento. El procedimiento se llevó a cabo a escala de laboratorio y los resultados obtenidos indican que el consorcio microbiano puede ser usado para dar un valor añadido a un residuo industrial ambientalmente indeseable.

Palabras clave: Consorcios microbianos, *Pseudomonas stutzeri*, biodegradación, residuos de destilación primaria, bio tensio-activos, bio emulsionantes, bio craqueo.

ABSTRACT

In the present study we report the bio treatment of the waste generated in the primary distillation of crude oil using a microbial consortium and a strain of *Pseudomonas stutzeri*. The sample for this study was the residual from La Pampilla refinery, which was donated by the company Repsol under our request. In fact, it was possible to fluidize the residual by mean of the action of the bacterial consortium and a strain of *Pseudomonas stutzeri*. The process may be explained as a bio cracking of heavy residuals taking place at room temperature. Prior to this process we proceeded to the spread of microbial consortium on the substrate (residual) to serve as inoculum in the phase of enrichment. The process was carried out at laboratory scale and the results obtained indicate that the microbial consortium may be used to give added value to an environmentally undesirable industrial waste.

Keywords: Microbial consortia, *Pseudomonas stutzeri*, biodegradation, waste of primary distillation, bio surfactants, bio emulsifiers, bio cracking.

Recibido: 18/04/2016

Aprobado: 20/05/2016

1. Introducción

El presente trabajo tiene como principal objetivo aportar conocimiento en el área del tratamiento de residuos de destilación primaria de hidrocarburos, mediante el estudio a escala real y de laboratorio de tratamientos enfocados a mejorar la degradación de borras de destilados de petróleo, para lo cual se utilizó un consorcio de microorganismo, donde destacan los géneros de *Pseudomonas* y *Desulfovibrio*, además de *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, en menor porcentaje.

El uso de estos agentes asociados en el caldo de cultivo constituido por el residual de la destilación primaria, es muy promisorio y sienta sólidas bases para su utilización en procesos de biorremediación en suelos y aguas contaminadas con petróleo.

Proceso de destilación primaria

La destilación primaria es un proceso donde el petróleo crudo se somete a tratamiento térmico en la columna de fraccionamiento, donde un grupo de cortes se obtienen con fines comerciales. A escala industrial de la columna consiste en una torre de 50 m de altura o más, con unos pocos metros de diámetro, donde nafta, kerosene, gasoil y compuestos pesados se separan [8]. Después de la separación de estos compuestos valiosos en la unidad industrial, sobre todo en funcionamiento continuo, un residuo sólido es siempre una carga del cual deben disponer las refinerías, la más de las veces mediante terceros a costos onerosos [9].

Físicamente hablando el residual es un material de color negro, sólido similar a la brea, de olor desagradable e intenso que contiene especies de alto peso molecular, lodos aceitosos, lodo con sulfuro y óxidos de fierro, azufre nativo, cemento refractario, hollín, polvo y cañuelas mezclado con compuestos de azufre y muchos otros hidrocarburos.

Proceso de Bio cracking

El uso del consorcio microbiano para digerir borras de destilación primaria, es esencialmente un proceso de bio cracking, donde los hidrocarburos pesados son sujeto de la acción del consorcio, que se encarga de reclamar su carga energética residual mediante acción enzimática compleja [1, 2, 10, 12, 13,16].

La explicación cualitativa de la ocurrencia probable de lo arriba descrito viene a ser la prueba de combustión del fluido obtenido, hecho que explica la digestión del material sólido por parte de los microorganismos, dicho de otro modo, ocurre el biocracking en frío [13].

Problema

En la destilación primaria del petróleo realiza la separación de hidrocarburos valiosos para su uso como combustible y otros procesos industriales, pero al mismo tiempo se genera un residuo semisólido lo cual constituye la borra o residuo que debe ser dispuesta finalmente por empresas especializadas en disposición de sólidos, con costos ambientales altos.

Por otro lado, la creciente dependencia del uso de combustibles derivados del petróleo tiene impacto negativo al originar problemas ambientales que afectan al planeta y la humanidad, tales como contaminación ambiental, calentamiento global, entre otros [4].

La preocupación ambiental tiene por su parte actores de diversa naturaleza, que confluyen en políticas de naturaleza internacional mediante foros de convergencia y acuerdos. En este espectro, diferentes campos de la ciencia se vienen involucrando para aportar soluciones que tiendan a mitigar estos impactos, dentro de los cuales podemos señalar la ciencia de los materiales, la nanotecnología, biotecnología, etc. Así, esta última reporta el empleo de surfactantes y/o microorganismos biodegradadores para tratar estos residuos de hidrocarburos. En el caso de los biosurfactantes estos compuestos disminuyen la tensión superficial de las interfaces aceite/agua, permitiendo su separa-

ción en fases distintas y posterior recuperación del hidrocarburo. [6,7].

Los microorganismos presentes en el suelo pueden utilizarse para biodegradar hidrocarburos si se diseña la correcta combinación de nutrientes y oxígeno, estos producen emulsificantes y surfactantes que rompen la tensión superficial entre el residuo y el medio acuoso lo que permite el acceso de los microorganismos a estar en contacto con la fuente de carbono [15,16, 18, 19].

De acuerdo con las características físicoquímicas de las muestras de destilación primaria de petróleo (borras) después del tratamiento con el consorcio microbiano, se recomienda realizar ensayos complementarios orientados hacia la posibilidad de acondicionar estos productos para su uso como combustible industrial (en hornos de ladrilleras, por ejemplo), de tal manera que se logre productos que satisfagan los controles de calidad de los mismos. Alternativa que podría investigarse es su uso como asfalto en caminos o carreteras de la costa, especialmente en los asientos mineros en los que se usa mucha agua para evitar el levantamiento de polvo.

2. Metodología y técnicas de investigación utilizadas

Primeramente se ha realizado la caracterización del residuo de la destilación primaria utilizando equipos localmente disponibles. En efecto, se ha

logrado caracterizar el lodo mediante inflorescencia de rayos X en el laboratorio de la Facultad de Biología de la UNMSM, cuyos resultados se reportan en la Tabla 1.

Datos obtenidos en el Laboratorio de equipamiento especializado. FCB-UNMSM, 2015.

Preparación de la muestra de borra

El residual de la destilación primaria es primeramente tratado físicamente para eliminar componentes extraños tales como arenisca, clavos, cartones, etc. Utilizando guantes en campana de extracción, debido al intenso olor por los elementos sulfurados que contiene.

Seguidamente se pesan muestras del residual y se someten a la acción de los agentes microbianos siguiendo un diseño experimental.

Tratamientos exploratorios del residuo primario fueron realizados para observar de manera cualitativa la solubilización del residuo primario frente al consorcio microbiano y a *Pseudomonas stutzeri*.

Se utilizó un consorcio microbiano donde destacan los géneros *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Arthobacter*, *Achromobacter* este consorcio se obtuvo de las plantas de tratamiento de aguas residuales [14] y una cepa de *Pseudomonas stutzeri* los cuales fueron activados en caldo nutricio estéril a pH 7.2, temperatura ambiente y 48 horas de incubación.

TABLA 1. Composición elemental del residuo primario (borra) antes del tratamiento¹

Element	Wt%	Ae%	Net Inte.	Bgnd.
C	92.71	94.97	1148.14	2.35
O	5.45	4.19	25.02	4.14
F	0.27	0.18	2.18	5.84
Na	0.26	0.14	7.05	12.69
Mg	0.17	0.08	7.69	16.20
Al	0.11	0.05	7.72	15.49
Si	0.11	0.05	11.90	16.16
S	0.79	0.30	170.57	13.39
Pb	0.00	0.00	0.00	13.24
Cl	0.04	0.02	11.65	13.50
Ca	0.06	0.02	31.13	9.88
Fe	0.03	0.01	11.51	4.65

¹ Datos obtenidos en el Laboratorio de equipamiento especializado. FCB-UNMSM, 2015.

TABLA 2. Características del tratamiento exploratorio del residuo primario (borra)²

N°	Aceite	Consortio microbiano	Borra	pH	Resultado observado
1	+	+	-	7.0	Mínima solubilización (< 3 %)
2	+	+	-	7.0	Mínima solubilización (< 3 %)
3	+	+	-	7.0	Mínima solubilización (< 3 %)
4	+	-	+	7.0	No hay solubilización (0 %)
5	+	-	+	7.0	No hay solubilización (0 %)
6	+	-	+	7.0	No hay solubilización (0 %)
7	+	+	+	7.0	Solubilización apreciable (>20 %)
8	+	+	+	7.0	Solubilización apreciable (>20 %)
9	+	+	+	7.0	Solubilización apreciable (>20 %)

2 Elaboración propia (-) Sin, (+) Con.

TABLA 3. Características del tratamiento exploratorio del residuo primario (borra)³

N°	Aceite	Consortio microbiano	Borra	pH	Resultado observado
1	+	-	+	7.0	No hay solubilización (0 %)
2	+	-	+	7.0	No hay solubilización (0 %)
3	+	-	+	7.0	No hay solubilización (0 %)
4	+	+	+	7.0	Solubilización apreciable (>20 %)
5	+	+	+	7.0	Solubilización apreciable (>20 %)
6	+	+	+	7.0	Solubilización apreciable (>20 %)

3 Elaboración propia (-) Sin, (+) Con.

En esta parte se hicieron pruebas con matraces agitados, utilizando un gramo de borra como única fuente de carbono con 2 concentraciones del consorcio microbiano y dos de la cepa de *Pseudomonas stutzeri*.

Se realizó la propagación del consorcio microbiano para su inoculación en matraces de 250 mL con 20 mL de caldo nutricio estéril a pH 7.2, temperatura ambiente y 48 horas de incubación.

El pH se determinó con un potenciómetro digital portátil. (pH Testr 2 OAKTON).

La cinética microbiana se llevó a cabo en matraces de 500 mL con 150 mL de medio mínimo tamponados con buffer de fosfatos (composición por litro: 0.75 g de KH_2PO_4 , 0.75 g de K_2HPO_4 , 0.71 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g de NaCl, 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) [5] y 1g de borra como única fuente de carbono a pH 7.2, se procedió a la inoculación de cada uno de los matraces con 5 y 10 mL del consorcio microbiano y *Pseudomonas stutzeri* y se incubaron a lo largo de siete semanas.

Para la determinación del número de microorganismos se siguió el método de diluciones seria-

das 10^{-2} 10^{-3} 10^{-5} etc, las cuales se sembraron en placas Petri con agar nutricio por difusión e incubadas a temperatura ambiente por 24 a 48 horas, luego se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

La biodegradación del residuo de destilación (borra) se verificó a lo largo del proceso siguiendo las cinéticas de crecimiento de los microorganismos tanto del consorcio microbiano como de la cepa de *Pseudomonas stutzeri*.

También se determinó la concentración de dióxido de carbono producido por el metabolismo microbiano mediante el método volumétrico.

3. Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra la composición de la materia prima (borra) al inicio del ensayo.

Las Tablas 2 y 3 muestran los tratamientos exploratorios que se hicieron al residuo primario de destilación de petróleo (borra) previos a su biodegradación. Se deduce que la biodegradación de la

borra por el consorcio microbiano conlleva un proceso de fluidificación del sustrato por la producción de biosurfactantes y bioemulsificantes para hacerlo accesible al ataque de la fuente carbonada por los microorganismos.

Cinética de crecimiento del consorcio microbiano

El crecimiento celular se determinó por el método de recuento de colonias en placas petri a lo largo de la cinética. La medición del recuento microbiano representado por las unidades formadoras de colonias (UFC) llegó hasta un máximo de 1.8×10^6 para el consorcio microbiano y de 1.2×10^6 para *Pseudomonas stutzeri* (Tabla 1 y figura 1). Estos valores son ligeramente superiores a los reportados por un estudio previo de Cornejo y colaboradores [3]. No se ha encontrado reportes similares en la literatura, sobre trabajos realizados con este residuo primario de destilación de petróleo.

El cuanto al comportamiento de la cinética microbiana en relación a la concentración del inóculo, podemos indicar que una mayor concentración del inóculo incidió en el acortamiento de la fase adaptativa o fase lag por una mejor adaptación del consorcio microbiano y cepa de *Pseudomonas*

TABLA 4
Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)⁴

Tiempo	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Consorcio microbiano
(Semanas)	UFC/mL	UFC/mL
1	1.6×10^5	2.5×10^5
2	3.0×10^5	3.8×10^5
3	4.2×10^5	5.1×10^5
4	5.9×10^5	6.6×10^5
5	7.5×10^5	9.8×10^5
6	1.2×10^6	1.8×10^6
7	6.2×10^5	8.1×10^5

4 Elaboración propia

stutzeri al medio de cultivo. El pH de trabajo de la cinética microbiana se mantuvo y controló a lo largo de la cinética de crecimiento, se observó una ligera variación que osciló entre 7.2 a 7.5 como se muestra en la figura 2. El pH de la cinética es propio de este tipo de microorganismos.

Como producto del metabolismo microbiano se genera la producción de CO₂. La figura N° 3 muestra la producción de CO₂ a lo largo de la cinética, viéndose un aumento y posterior disminución debido a la muerte celular generado por el

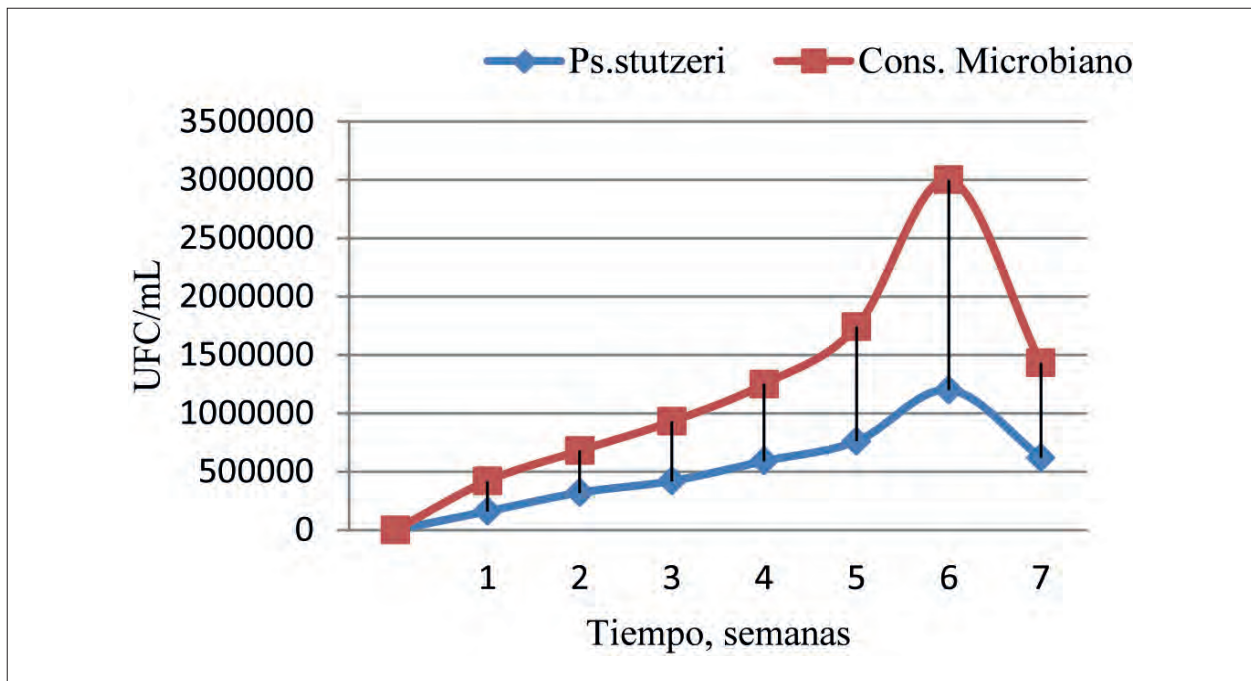


Figura 1. Cinética de crecimiento microbiano.

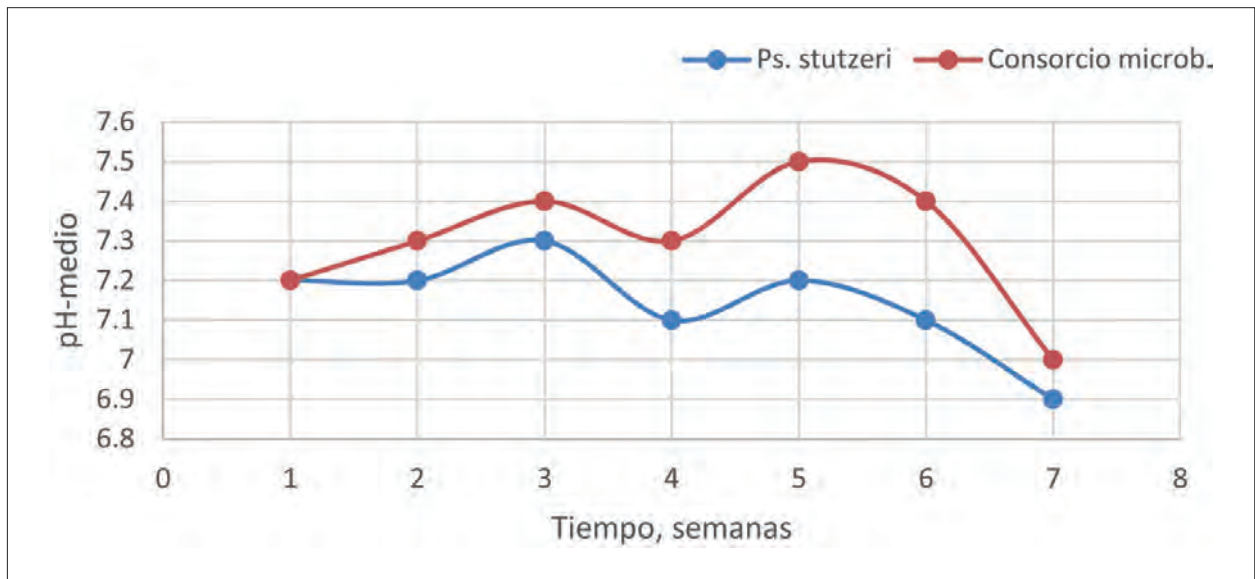


Figura 2. Variación de pH durante la cinética de cultivo.

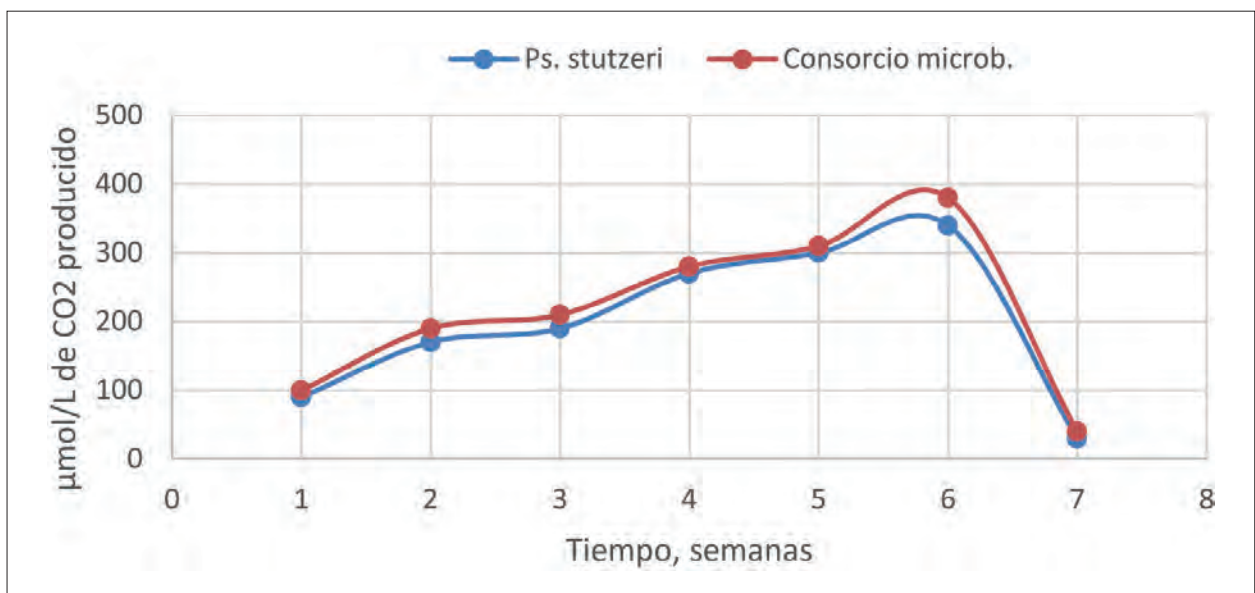


Figura 3. Perfil de producción de CO₂ durante proceso microbiano.

consumo de la fuente carbonada proveniente del residuo de destilación primaria (borra).

4. Conclusiones

1. Se logró el objetivo del estudio, esto es, fluidificar las borras de destilación primaria de petróleo, usando consorcios microbianos obtenidos de lodos de tratamiento de aguas y una cepa de *Pseudomonas stutzeri*, los cuales

producen biosurfactantes y bioemulsificantes que facilitan el acceso a la fuente de carbono, en un proceso sinérgico.

2. El producto del tratamiento es un fluido combustible que apropiadamente caracterizado puede ser usado como agente de mezcla de otros combustibles.
3. La cinética microbiana demostró que el material sobre el cual actúa es complejo y de difícil acceso por parte del consorcio microbiano y de *Pseudomonas stutzeri*.

5. Recomendaciones

1. Se recomienda procesos de bioaumentación complementarios al uso de consorcios microbianos.
2. Utilización de estos consorcios microbianos para procesos de biorremediación de suelos y cuencas hídricas contaminados con petróleo.

6. Referencias bibliográficas

- bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. Submitted to Science of the Total Environment.
- [11] Amézcuca-Allieri M., Meléndez-Estrada J., Rodríguez-Vázquez R., Lead J. (2003). Phenanthrene removal in a selected Mexican soil by the fungus *Penicillium frequentans*: Role of a C: N ratio and water content. 2003. Soil and Sediment Contamination. Soil and Sediment Contamination. 12 (3) 387-399.
- [12] Palomino,IRA. (2011). Evaluación de Agentes Microbianos para su empleo en licuefacción de borras de destilación de petróleo. Exposición hecha para representantes de la compañía IMC Group Perú SAC, 2004.
- [13] Palomino,IRA, Cornejo O., Palomino IAL, Woolcott J., Salas N., Lengua R., Sandívar J., Gómez H. y Carhuacho H. (2010). Bio cracking of heavy waste oils generated in oil refining. Journal Fenómenos de Transferencia. Oct. Vol. 6 N°1 pp.73-74.
- [14] Echeverri, G, E; Manjarrez, G; Cabrera, M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo de hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena Colombia. Nova. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Vol. 8.
- [15] Llado, S. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicados. Ac. De Biología. UB. Universitat de Barcelona.
- [16] Contreras, V. A. (2014). Aislamiento y adaptación de microorganismos fúngicos con actividad hidrocarburoclasta. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, Xalapa.
- [17] Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnology Research International.
- [18] Kostka, J., Prakash, O., Overholt, W., Green, S., Freyer, G., & Canoin, A. (2011). Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deep water Horizon Oil Spill. Appl. Environ. Microbiol. , 77 (22), 7962-7974.
- [19] Milton, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., y otros. (2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. FEMS Microbiology Ecology, 74, 669– 681.
- [1] Palomino, IRA. (2005). Curso Internacional de Seguridad: Paradigma EHS, FQIQ UNMSM, Lima.
- [2] Palomino, IRA. (2004). Curso Internacional de Seguridad en Laboratorios y Plantas Industriales, FQIQ; UNMSM, Lima.
- [3] Cornejo O. y otros (2014). Biocracking de residuos de destilación primaria para reclamar energía. Informe de investigación.
- [4] Kalinci, Y., A HepBasli e I. Dincer, (2009), Biomass-based hydrogen production: A review and analysis, Int J Hydrogen Energy, 34(#):8799-8816.
- [5] Lehmann D. y Lutke-Eversloh T. (2011) Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway Metabolic Engineering13 (#):464-473.
- [6] Nistchke, M e Pastore, G.M. (2002). Biosurfactantes: Propiedades e aplicações. Química. Nova. Vol. 25, N° 5,772-776.
- [7] Santa Ana, L.M; Sebastián, G.V; Menees, E.P; Alves, T.L.M; Santos, S; Pereira Jr, N. And Freire, D.M.G. (2002). Production of biosurfactans from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in environments. Brazilian Journal of Chemical Engineering. Vol. 19, N° 2, pg. 159-166.
- [8] Molina Barahona L., Rodríguez-Vázquez R., Hernández-Velazco M., Vega-Jarquín, Zapata-Pérez O., Mendoza-Cantú A., Albores A., (2004). Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. Applied Soil Ecology. 27, 165-175.
- [9] Kamm, B. y M. Kamm, (2004), Principles of biorefineries, Appl. Microbiol Biotechnol. 64(#): 137-141.
- [10] S. Lladó, S. Covino, A.M. Solanas, M. Viñas, M. Petruccioli and A. D'Annibale. (2012). Comparative assessment of

7. Anexo



Figura A1. Tubos de ensayo con muestras



Figura A2. Reactivos y matraces



Figura A3. Cultivo de microorganismos



Figura A4. Borra



Figura A5. Emulsificante

Determinación de carbonatos con una valoración de NaOH

Consiste en hacer reaccionar el dióxido de carbono contenido en una muestra de agua con hidróxido de sodio (NaOH), gracias a la presencia de un indicador (fenolftaleína). El cual provoca que la muestra de agua aumente su pH hasta un valor de 10, por tanto, pasa a tener un pH ácido a un pH básico.

Material y procedimiento para la valoración de la muestra de agua con el hidróxido de sodio

Material

- Una probeta de 100 mL
- Bureta graduada.
- Erlenmeyer de 250 mL
- Aparato agitador.
- Imán.
- Pinzas

Reactivos

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) de 0,02N.
- Solución indicadora fenolftaleína.

Procedimiento

- Tomar una muestra de agua del depósito de reserva mediante el grifo de purga. Colocar la goma del grifo en el fondo de la probeta de 100 mL, de modo que no forme burbujas.
- Traspasar el agua de la probeta al Erlenmeyer de 250 mL y añadir 10 gotas de indicador fenolftaleína. Si la muestra vira a color rosa indica que no hay presencia de dióxido de carbono libre.
- En el caso de que la muestra siga siendo incolora, hay que realizar una valoración con el hidróxido de sodio 0,02 N. Añadir gota a gota la solución valorada mediante la bureta, hasta que vire la muestra en un color rosa.
- Se debe analizar el agua antes de limpiarla y después de limpiarla.
- Todos los análisis deben realizarse por triplicado.

- Calcular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ppm = \frac{Ax0,02x44000}{B}$$

Donde:

- A: volumen de NaOH utilizado en la valoración (mL).
- B: volumen inicial de muestra (mL).

Placas del ensayo exploratorio

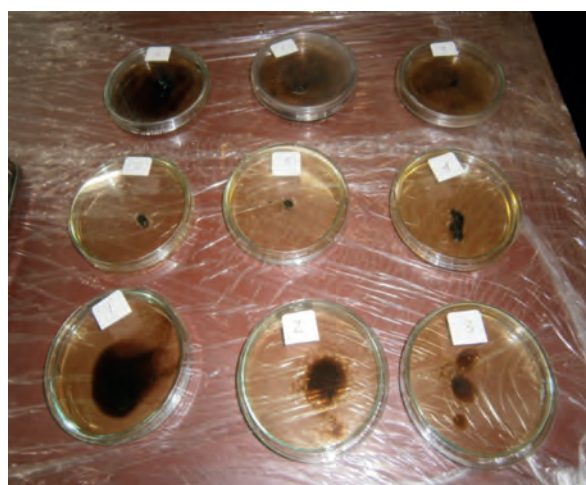


Figura A6. Tratamiento previo del residuo primario.



Figura A7. Resultados del pre tratamiento del residuo primario

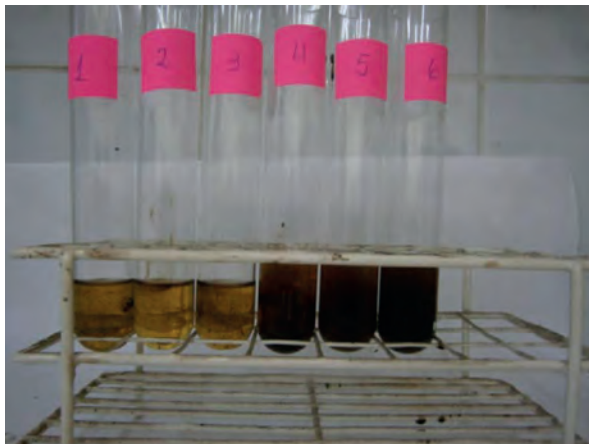


Figura A8. Residuo primario después del tratamiento.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento a la compañía Repsol, por la gentileza de facilitarnos la muestra para este estudio y al CSI de la UNMSM, por el financiamiento recibido para llevar a cabo este estudio.



Figura A9. Matraces conteniendo muestras en tratamiento con microorganismos