

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 (Brockfield) 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-metiléterbutil 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 clúster 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)	9.8×10^3	1.63×10^3	7.80×10^3
BDH (UFC/g)	1.04×10^3	1.64×10^3	7.8×10^3

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%).

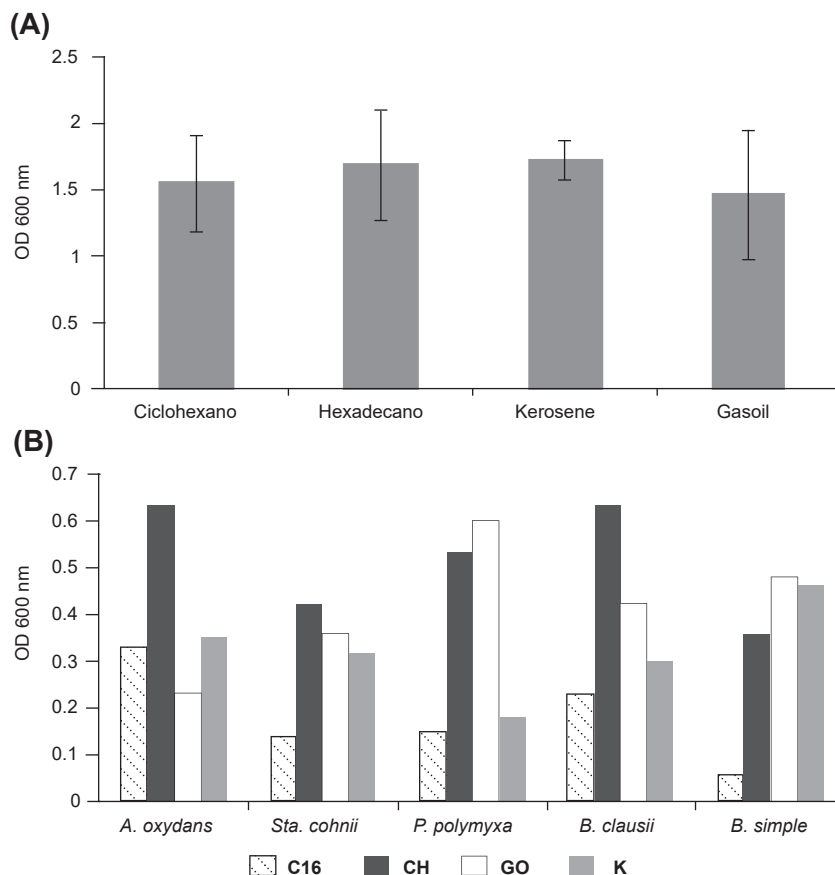


Figura 1. Valores promedio de las observancias a 600 nm para el desarrollo de los microorganismos aislados con los hidrocarburos estudiados: gasoil (GO), kerosene (K), ciclohexano (CH), hexadecano (C16).

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 cerius* 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 sphaericus* están en centro porque son compartidas por todas las relaciones de gasoil - agua.

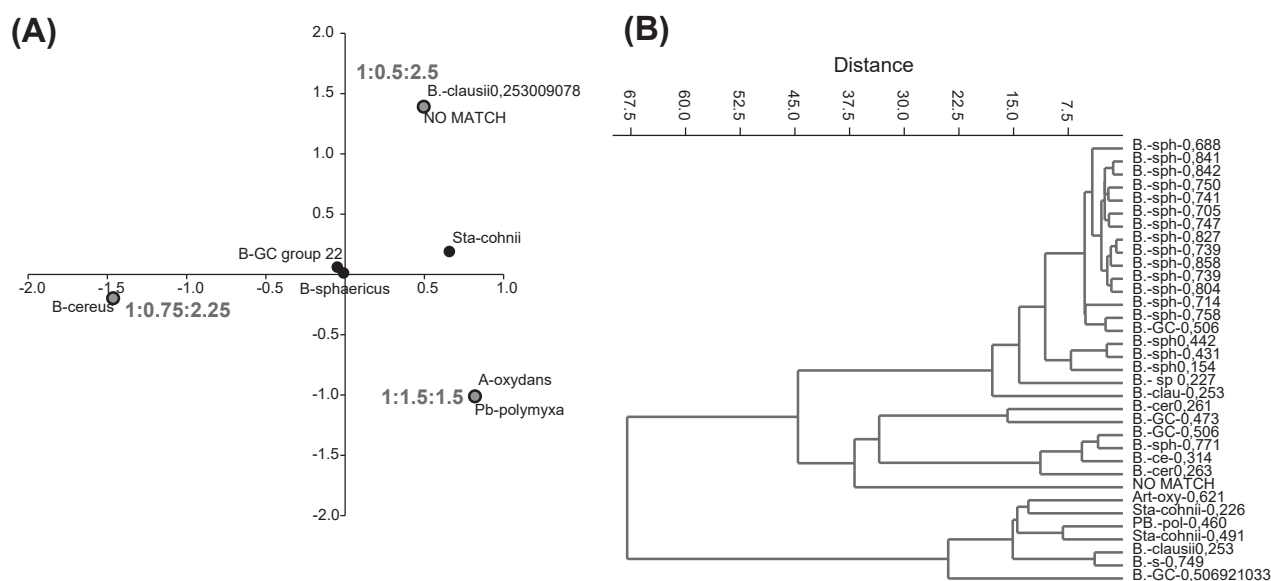


Figura 1. (A) Análisis de CA de las bacterias identificadas y de donde fueron aisladas. (B) Análisis de agrupamiento usando el índice de distancia Euclidiana y agrupamiento UPGM. de los ácidos grasos de las bacterias identificadas. B-sph: *Bacillus sphaericus*, B-cer: *Bacillus cereus*; PB-pol: *Paenibacillus-polymyxa*, Sta-cohnii: *Staphylococcus 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-Tornisielo 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 biodisponibilidad 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-alcános 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 I, 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, Bertonicini 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 incurrir 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.