

ELECTROBIORREMEDIACIÓN (EBR) NUNA TÉCNICA APLICABLE A RESIDUOS DE HIDROCARBUROS DEL PETROLEO RECALCITRANTES

**Dra. Graciela G. Pucci, Bioq. Adrian J. Acuña, Tec. Victor Diaz, Lic. Natalia Tonin
y Dr. Oscar H. Pucci**

La industria del petróleo utiliza diferentes técnicas para eliminar la contaminación por hidrocarburos. La elección de la técnica depende de la concentración del contaminante y del volumen a descontaminar. Un método que se usa con mucho éxito es la biorremediación que elimina grandes cantidades de hidrocarburos alifáticos (HALI), un grupo importante de hidrocarburos poliaromáticos (HPA). De estos últimos hay una acumulación en los llamados Landfarming y en algunas biopilas. La legislación actual es muy estricta en cuanto a la concentración de los HPA que limita la disposición final de los suelos contaminados. En el presente trabajo se utiliza una técnica híbrida que combina la biorremediación con campos eléctricos de corriente continua, que producen tres tipos de movilidad en suelos, la electroforesis, electroendoósmosis y la eletromigración que implican una mayor biodisponibilidad de contaminantes y una movilidad de las bacterias. Se utilizaron 3 biorreactores con tratamientos distintos, con humedad, con humedad y nutrientes, con humedad, nutrientes y campo eléctrico. Los resultados iniciales indican que la biorremediación del petróleo por medio del landfarming aplicado eliminó el mayor porcentaje de HALI, permaneciendo algunos HPA. La cromatografía gaseosa del residuo y los testigos después de aplicar electrobioremediación (EBR) indica una importante eliminación de HPA con respecto a los testigos.

La EBR es una técnica que se utiliza para descontaminar suelos con hidrocarburos y otros contaminantes de gran importancia como fenoles, cresoles y metales pesados. El objetivo de este trabajo es conocer la factibilidad de uso de esta tecnología híbrida para pasivos ambientales de suelos de la cuenca del golfo San Jorge. Se trabajó con un suelo no saturado proveniente de un landfarming, la antigüedad de este proceso fue superior a los 6 años y el hidrocarburo original fue biodegradado quedando solo residuos recalcitrantes. El tratamiento consistió en la aplicación una diferencia de potencial de $0.5V\text{ cm}^{-1}$ con agregado de nutrientes y de humedad, durante 150 días, en cubas de vidrio con tres compartimentos dos para electrolitos y el tercero para la realización del proceso, los laterales y el central se comunicaron con puentes salinos de fosfatos. Los valores de hidrocarburos totales disminuyeron de 4.22% a 3% (considerando todas las fracciones, alifáticos, aromáticos y asfaltenos que variaron en sus porcentajes después de la EBR). Las modificaciones del pH fue de 7,96 a 8,6 en el cátodo y a 7,1 en el ánodo siendo ambos valores compatibles con la actividad bacteriana degradadora de hidrocarburos, el tamaño de la bacteriobiota no presentó modificaciones. En el cátodo se incrementó la cantidad de bacterias gram positivas.

Introducción.

Desde hace más de un siglo se realiza la explotación petrolera en el Golfo San Jorge, durante este tiempo se modificaron legislaciones ambientales nacionales y provinciales. El tratamiento de los pasivos ambientales lleva a probar diferentes técnicas para eliminación de hidrocarburos que poseen los suelos patagónicos que muchos de ellos poseen años de contaminación y degradación de hidrocarburos (lo que con modificaciones hoy se denomina atenuación natural). En la actualidad, la región utiliza las técnicas de landfarming, biopilas y biorremediación asistida in situ para resolver estos problemas que dan excelentes resultados cuando se aplican con rigurosidad. Los hidrocarburos alifáticos se eliminan con mayor velocidad y más lentamente con los hidrocarburos aromáticos y polares. Uno de los inconvenientes de estos últimos hidrocarburos es la biodisponibilidad que ha tratado de resolverse con el agregado de surfactantes que en la mayoría de los casos puede producir lixiviados importantes. La aplicación de electrorremediación aumenta la disponibilidad de los hidrocarburos favoreciendo la posterior degradación de los mismos (Wick et al. 2006). Esta técnica ha sido ensayada en laboratorios y existen numerosas publicaciones con suelos saturados contaminados con un compuesto puro.

Hay numerosos trabajos sobre biodegradación de los mismos autores de éste que demuestran la importancia y aplicabilidad de la bioremediación, con cualquiera de sus técnicas (biorremediación in situ, landfarming, biopilas, etc) en suelos patagónicos. En estos trabajos en general se llega a la conclusión que es una tecnología aplicable en base a su ecuación costo beneficio muy conveniente. En un caso de landfarming se detectó que si bien los valores de TPH eran menores que los permitidos por las normas provinciales cuando se estudiaban individualmente los hidrocarburos aromáticos polinucleares no se cumplían con estas normas.

La electrorremediación es la tecnología para restaurar suelos contaminados por la aplicación de un campo eléctrico a partir de corriente directa, De la Rosa-Perez et al. (2007). Los mecanismos de remoción principales son la electromigración, la electroósmosis, y la electroforesis. Electroósmosis: movimiento del agua desde el ánodo al cátodo en una celda electrolítica. Electromigración: transporte de iones y complejos iónicos al electrodo de carga opuesta. Electroforesis: transporte de partículas cargadas o coloides bajo la influencia de un campo eléctrico.

La electroósmosis es función del grado de saturación del suelo, por ello es un actor primordial en la electroremediación. Se observa una distribución anormal en la humedad del suelo ya que el electrolito se mueve en dirección de uno de los electrodos, el cátodo, aumentando la humedad de este y disminuyendo la del ánodo. Esta disminución se encuentra asociada con el desarrollo de poros de presión negativa, variación de pH y de la fuerza del campo eléctrico, lo cual resulta en tasa de flujo electroosmóticos irregulares (Lindaren et al. 1994, Laureen et al. 1997, Rosa Perez et al. 2007)

La electrorremediación ha demostrado su capacidad de remover algunos contaminantes orgánicos como tricloroetileno e hidrocarburos en estudios de laboratorio y en campo, (Martínez 2001, Molina et al. 2004). La aplicación que se ha comunicado con mas frecuencia es la recuperación de suelos contaminados con metales, como Cr, Cd, Hg, Pb, Mn, Zn y As (Hamed et al. 1991, Acar et al. 1994, Hicks y Tondorf 1994, Reed et al. 1995, Acar y Alshawabkeh 1996, Cox et al. 1996, Hansen et al. 1997, Kim y Kim 2001, Suer et al. 2003, Pazos et al. 2006).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ELECTROREMEDIACIÓN

HUMEDAD:

La humedad tiene importancia máxima dado que actúa como disolvente de sales que forman los electrolitos, además el flujo electroosmótico está en función del contenido de agua que en suelos saturados se ve incrementado. La migración de los electrolitos produce un incremento en el mismo sentido de la humedad disminuyéndola en el polo contrario. Esta disminución implica el desarrollo de poros con presión negativa, variaciones en el pH y variaciones en sectores del campo eléctrico, todos estos factores influyen en el flujo electroosmótico tornándolo irregular. (Larsen 1997, Lindgreen et al. 1994).

La sequedad del suelo puede deberse también, al calentamiento por el paso de corriente o por reacciones exotérmicas. (Shapias y Probstein 1993).

Debe establecerse en equilibrio entre la migración electro endoosmótica, evaporación por calentamiento y/o reacciones exotérmicas y el aporte de electrolito en el ánodo (si las condiciones son normales).

pH:

El pH promueve interacciones entre metales y otros compuestos que forman parte natural del suelo, esto regula la disponibilidad de los contaminantes. (Acar y Alshwabken 1993, Hicks y Tondorf 1994, Virkutyte et al. 2002). El paso de corriente directa en un suelo con agua produce la electrolisis, generando iones hidrógeno en el ánodo e hidroxilos en el cátodo.

Cátodo: $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{OH}^- + \text{H}_2$ $E^\circ = -0,83 \text{ V}$ (Alcalino).

Ánodo: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^-$ $E = 1.2.3 \text{ V}$ (Ácido).

La aplicación de un campo eléctrico a un suelo en un reactor, induce a un gradiente de pH (Jackson et al. 2001, Mattson et al. 2002), debido a la electrólisis que produce protones en el ánodo haciendo que se forme un frente ácido que avanza hacia el cátodo.

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL SUELO

La conductibilidad del suelo depende de la concentración y la movilidad de los iones presentes. La remoción del contaminante decrece con la reducción de la concentración (Reddy et al., 1997, 1999; Reddy y Chinthamreddy. 1999; Zelina y Rusling, 1999). Esto es debido al intercambio de ión hidrógeno con el o los contaminantes catiónicos en la superficie del suelo, con la liberación de contaminantes. Cuando el contaminante es removido, la concentración del ión hidrógeno en el fluido del poro del suelo aumenta, produciendo un incremento en la corriente por los iones hidrógeno en lugar de por el contaminante catiónico.

NATURALEZA QUÍMICA DEL CONTAMINANTE.

La naturaleza química del contaminante y su estado tienen influencia en el desarrollo de la electroremediación por electromigración, la situación ideal se presenta cuando el contaminante se mantiene disuelto en el electrolito y no precipita por cambios de pH ni se producen cambios en contacto con los electrodos ni interaccionan con las partículas del suelo. Esta consigna es parcialmente cumplida por metales pesados y algunos compuestos orgánicos como fenoles u otras con carga eléctrica. En el caso de los hidrocarburos presentes en el petróleo no cumplen con estas condiciones ya que en general no tienen carga eléctrica o la poseen en muy baja intensidad, se adsorben sobre las partículas del suelo y son escasamente solubles en agua, en estas condiciones tiene importancia la electroendoosmosis que permite la migración de estos compuesto en el mismo sentido que esta.

Por lixiviación selectiva se ha demostrado que formas intercambiables, migran con mayor rapidez que las en materia orgánica o las que quedan en la fracción residual (Suer et al. 2003, Kim y Kim 2001, Reddy et al. 2001, Turer y Gene 2005).

EL POTENCIAL ZETA (ζ) es la propiedad que determina la carga de un coloide (en V) en función de la superficie cargada y del medio en que se encuentra. Las sales totalmente ionizables no son coloides por los que su potencial ζ es muy pequeño. El potencial ζ en la mayoría de los suelos es negativo. Con el aumento de la acidez disminuye la negatividad del potencial ζ pudiendo alcanzar valores positivos (Lorenz 1969). El aumento del valor potencial $\zeta(*)$ afecta el flujo electroendoosmótico.

LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS como capacidad de absorción, de intercambio iónico, capacidad Buffer (pH) y carga superficial tienen marcada influencia en la electroremediación ésta presenta resultados exitosos en suelos arcillosos, de granulometría fina y permeabilidad baja. Los suelos arenosos deben tener una estructura impermeable a una profundidad razonable que permita un elevado grado de humedad o saturación (Virkutyte et al. 2002). Los metales y sustancias orgánicas iónicas, que se absorben inducen un menor rendimiento. (Ravera et al. 2006). Las arcillas tienen carga superficial negativa por lo que retienen a metales y a materia orgánica con carga positiva (Sposito 1989).

El tratamiento de un suelo con corriente directa puede producir cambios en granulometría, contenido en materia orgánica, cantidad de sales solubles. Estos parámetros a su vez modifican las posibilidades de electrobiorremediación.

Normalmente, el diseño de la célula electrocinética en los experimentos del laboratorio consiste en un arreglo de los electrodos que permita la inyección del fluido del proceso en el medio poroso, con la evacuación en el otro electrodo del fluido contaminado, Sogorka et al., 1998; Reddy and Chinthamreddy, 1999; Reddy et al., 1997, 1999; . Zelina and Rusling, 1999

La imposición de un gradiente eléctrico entre dos electrodos inertes produce un flujo electroosmótico hacia el cátodo, algunos autores proponen introducir directamente los electrodos en el suelo húmedo produce el efecto más deseable (Sims, 1990; Acar and Alshawabkeh, 1993; Reddy et al., . 1999; Sogorka et al., 1998). Otros, prefieren no introducir directamente los electrodos en el suelo mojado sino que lo hacen en un electrolito separado por membranas u otros materiales que permitan el paso de la corriente (Van Cauwenberghe, 1997; Baraud et al., 1998; Benazon, 1999).

Deben usarse electrodos inertes a la disolución anódica durante el proceso del remediación. Los electrodos más convenientes usados para los propósitos de investigación incluyen grafito, platino, oro y plata. Sin embargo, para los estudios piloto, es más apropiado usar electrodos menos caros, aunque también fiables como el acero inoxidable. Usando electrodos inertes, las reacciones en los electrodos producirán iones de H^+ y el gas de oxígeno en el ánodo e iones de OH^- y gas de hidrógeno en el cátodo. Si el pH no es controlado, un frente ácido se propaga por los poros de la tierra del ánodo al cátodo produciendo cambios de pH en franjas estrechas de suelo que modifican sustancialmente la solubilidad de metales y la supervivencia de bacterias.

Para solucionar el problema de los cambios de pH por el frente ácido y en los electrodos se ha propuesto la inversión alternativa de la polaridad de los electrodos, el uso de puentes salinos o el uso de compartimentos donde se colocan los electrodos y se permite el paso de corriente por intermedio de membranas.

Con el fin de mejorar los procesos de electroremediación se han propuesto procesos híbridos que combinan la técnica de electrorremediación con alguna otra variante tecnológica buscando mejorar o complementar la capacidad de remoción.

TRATAMIENTO ACÚSTICO: El ultrasonido tiene la capacidad de ayudar a desorber los contaminantes de las partículas del suelo a través de la vibración provocada por las ondas sonoras. Al aplicarlo con un campo eléctrico de corriente directa permite remover y transportar al electrodo correspondiente iones de un suelo contaminado. Esta variante se ha probado para remover zinc y cadmio de suelos arcillosos (Muralidhara et al. 1990).

BIORREMEDIACIÓN: a esta técnica se le ha llamado bioelectrocinética o bioelectroremediación. Se combina la aplicación de la corriente eléctrica directa con técnicas de biorremediación asistida con nutrientes, aireación y humidificación. Se busca estimular la biodegradación de contaminantes orgánicos al introducir nutrientes para las bacterias dentro del suelo, de manera que el campo eléctrico desorbe los contaminantes incrementando su disponibilidad para que los microorganismos los incorporen a su metabolismo, o bien sean estabilizados como resultado de reacciones químicas entre el contaminante y productos metabólicos como el sulfuro y metales divalentes (Maini y Sharman 1999, Gent y Bricka 2001). Esta modificación ha sido probada con moléculas orgánicas sintéticas como TNT, BPC y pesticidas, entre algunos otros (Marks et al. 1994) y metales pesados como cobre (Maini y Sharman 1999).

ELECTRODIÁLISIS: esta técnica remueve parcialmente contaminantes inorgánicos. Consiste en utilizar membranas selectivas en los pozos electrolíticos, de forma que los metales no puedan dispersarse en el suelo nuevamente si existieran interrupciones en la energía que genera el campo eléctrico. Hansen et al. 1997 utilizaron esta técnica en suelos contaminados con cobre empleando membranas selectivas de iones en el cátodo para prevenir la migración de los metales recuperados (Cu_2^+).

FITORREMEDIACIÓN: el campo eléctrico hace migrar los contaminantes a través de una zona cultivada con especies vegetales capaces de transformar o integrar el contaminante a su fisiología (Huang et al. 1997, O'Connor et al. 2003). En este caso la eficiencia de la técnica no mejora significativamente y se incrementa el tiempo del tratamiento al buscar la especie adecuada, realizar la siembra y esperar a que la planta transforme e incorpore el contaminante.

COMUNIDADES BACTERIANAS CULTIVABLES QUE UTILIZAN HIDROCARBUROS

Las bacterias tienen carga negativa en sus membranas (membranas energizadas) y los cambios de pH de los suelos generan modificaciones que les permiten migrar por electroforesis hacia uno de los electrodos dependiendo del valor de pH (Suní and Romantschuk 2004). Los pH 7 o mayores (como se presentaron en estos sistemas) generan una carga negativa que conlleva a una migración de las bacterias en dirección al ánodo (De Flua et al 1997), si bien la velocidad en medios acuosos es rápida 5cmh^{-1} en suelos es menor esta velocidad y cae a $5\text{cm} \cdot 6\text{h}$, cuando el pH es de 5.5 y a pH más bajos movimiento se modifica la carga de la membrana siendo esta positiva y esto conlleva a un cambio de dirección al cátodo.

La complejidad de las cargas superficiales que poseen las membranas bacterianas hace difíciles poder predecir el comportamiento de las mismas con los parámetros biofísicos (Bayer and Sloyer 1990). La composición de los polímeros de las bacterias contiene grupos como los carboxílicos, sulfatos, fosfatos o grupos aminos, por lo que posee grupos ácidos y básicos dando una superficie anfotérica que posee carga negativa a pH altos y carga positiva a pH bajos.

El aumento de la biodisponibilidad de compuestos orgánicos y por ende un aumento en la biodegradación de los mismos fue estudiado por Wick et al 2006. Existen diferentes factores que influyen en el proceso principalmente para los suelos patagónicos, pH se produce una acidificación en el ánodo y una alcalinización en el cátodo, contenido de agua en un porcentaje óptimo para el pasaje de corriente.

El objetivo de este trabajo es conocer la factibilidad de uso de esta tecnología para pasivos ambientales de suelos contaminados con hidrocarburos de la cuenca del golfo San Jorge.

Desarrollo.

Análisis físico químicos: Se analizaron en los siguientes parámetros químicos bajo las normas EPA (Environmental protection agency), API American Petroleum Institute, SM (Standard methods) : bicarbonatos (API RP-45), calcio y magnesio (ASTM D-511), carbonatos (API RP-45), Cloruros (ASTM D-512-B); nitratos (EPA 352.1), nitritos (SM 4500), pH (EPA 9040C), sulfato (SM 4500-E), fosfato (SM 4500-C), amonio (EPA 350.1), Temperatura (EPA 170.1), hierro ASTM D-1068^a, humedad Secado a 105°C , densidad real y densidad aparente (García Trejo 1981). Determinación de los hidrocarburos totales del petróleo: EPA 1664, EPA 3636.

RECUENTOS BACTERIANOS: Los recuentos de microorganismos se efectuaron a partir de suspensiones de 10g de muestra y 100mL de agua destilada estéril, con agitación en vortex. Se realizaron diluciones decimales a partir del sobrenadante. Los medios de cultivo utilizados fueron:

Medio R2A (Reasoner et al., 1985): Extracto de levadura 0.5g, peptona ácida de caseína 0.5g, casamino ácido 0.5g, glucosa 0.5g, almidón 0.5g, acetato de sodio 0.5g, fosfato ácido di potásico 0.3g, sulfato de magnesio decahidratado 5g, sulfato de sodio 36.6g, cloruro de sodio 0.99g, cloruro de potasio 7.513g, cloruro de magnesio 1.42g, bicarbonato de sodio 1.008g, agar-agar 14g, agua destilada 1000mL.

MM-POG Medio base mineral: Solución I: Cloruro de calcio 0.235g, nitrato de potasio 0.427g, sulfato de amonio 5g, cloruro de magnesio hexahidratado 1g, bicarbonato de potasio 1.2. Solución II: fosfato ácido di sódico dihidratado, fosfato monopotásico 0.5g de cada uno. Solución III: EDTA-Na 800g, cloruro ferroso 300g, cloruro de calcio hexahidratado 4g, cloruro de manganeso tetrahidratado 10g, sulfato cúprico 1g, permanganato de potasio dihidratado 3g, cloruro de zinc 2g, cloruro de litio 0.5g, al cual se le agregó 30uL de petróleo-gasoil por diseminación en superficie. A 20mL de MM distribuido en placa, y una vez solidificado, se le agregan 30uL de una mezcla 1:1 de petróleo gasoil, diseminándola sobre la superficie.

ECOLOGÍA Y COMUNIDADES BACTERIANA. De las 90 cepas aisladas de los medios de cultivo MBM-PGO se realizará una identificación por el uso del método Sherlock MIDI versión 6.0. La identificación de las cepas seleccionadas se realizó por FAME. La extracción los ácidos grasos de membrana 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 6 N y alcohol metílico (325 mL: 275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metil terbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10,8 g – 900 mL) de acuerdo con el procedimiento del sistema de identificación (MIDI Newark, Del., USA).

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS E IDENTIFICACIONES BACTERIANAS. Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud y 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 pico se efectuó mediante HP 10.01 Chem Station, los ácidos grasos fueron identificados utilizando Sherlock (versión 6.0) con el estándar Agilent “Calibration standards kit for the microbial identification system”. La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico (MIDI).

Se tomó como criterio de identificación de los microorganismos que el índice de similitud sea mayor a 0,5 considerando lo propuesto por Brow & Leff (1996) que valores comprendidos entre 0,3 y 0,5 de éste índice proporciona una identificación de la cepa como un cultivo atípico.

Análisis de hidrocarburos. Los hidrocarburos, tanto el original anterior al landfarming, como el inicial de la electrobioremediación y los finales de cátodo, ánodo y central se efectuaron por cromatografía gaseosa.

EXPERIENCIA DE ELECTROBIOFEMEDIACIÓN. Las dimensiones de la cuba (67cm de largo, 15cm de alto, 15cm de ancho) divididos en tres compartimientos dos de ellos de 5x15x15cm (Figura 1 y 3), en donde se colocan los buffer y se comunican con el compartimientos del suelo por el uso de puentes salinos (Figura 2). Se utilizó una solución de buffer 1M (K_2HPO_4 / KH_2PO_4) ajustado a pH 8,0 para el compartimiento del ánodo y pH 5,8 para el cátodo (Niqui Arroyo et al 2006). La humedad del suelo en las cubas electroforéticas fue entre un 12-15%. Se utilizó un voltaje de 0.5V/cm (Wick et al 2004). Las cubas contenían 4kg de suelo a la que se añadió nutrientes 100:5:0,5. Se realizaron en simultáneo dos cubas más, una con el mismo agregado de nutrientes y la otra cuba solo con el agregado del agua para obtener la misma humedad.

Figura 1. Diseño de la cuba utilizada para la experiencia de electrobiorremediación.

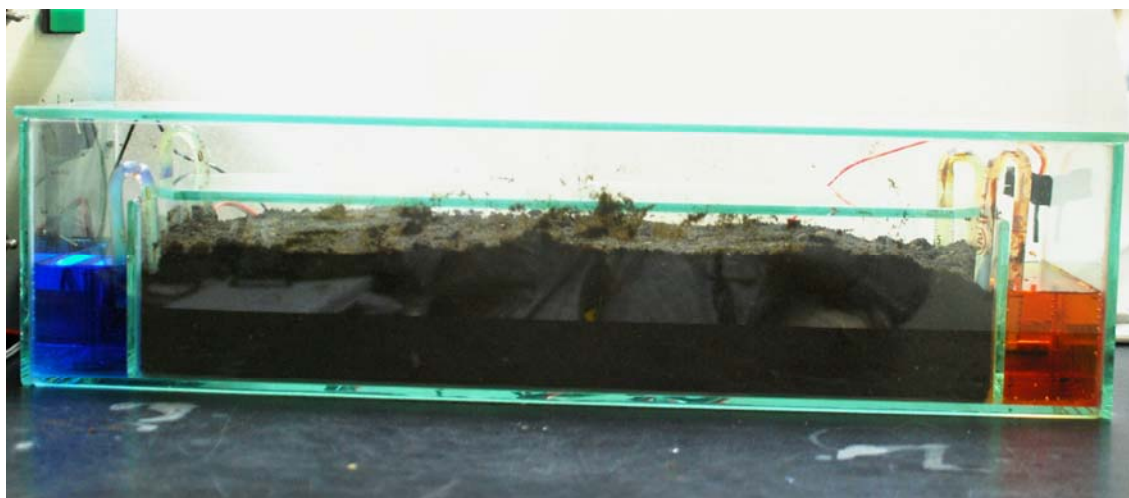
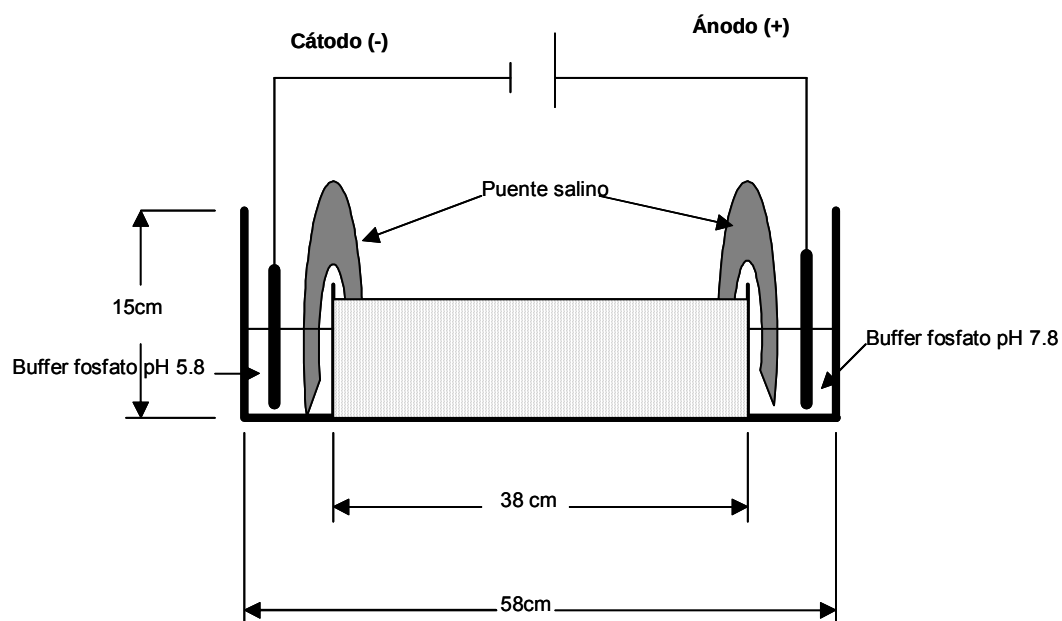


Figura 2. Puentes salinos utilizados.



Figura 3. Esquema del diseño de la cubas utilizada.



Resultados y Discusión.

De la Rosa-Perez et al (2008) han comunicado que los suelos electrorremediados pueden exhibir cambios en su granulometría, contenido de materia orgánica, cantidad de sales solubles, conductividad eléctrica, y que tienden a acidificarse y a disminuir o perder su contenido en sales inorgánicas como nitrato, fosfato y sulfatos, empobreciendo el suelo. En esta experiencia se presentaron migraciones de nutrientes y se modificó la biodisponibilidad de los fosfatos incrementándose su concentración en el suelo concordando con los resultados encontrados por Xuejun et al 2006. El fosfato se mantuvo en una mayor concentración en el cátodo situación que puede deberse a dos procesos uno es la migración electroosmótica y otro el aporte que pueden haber efectuado los puentes salinos, cualquiera haya sido el mecanismo o su combinación aumentaron la biodisponibilidad de fosfatos. Goontaeck et al 2006 sugieren la utilización de ETP (thietyl phosphato) ya que este no es captado por el caolín y mantiene los valores de fosfatos constante para una mejor degradación de hidrocarburos otro problema del agregado de fosfato en los suelos que contienen calcio

con el que forman una sal insoluble, precipita y no esta biodisponible para las bacterias. Los nitratos poseen una relativa alta movilidad (Thevanayagam and Rishindran 1998). El aumento de nitratos y nitritos (Cuadro I) se debe a bacterias nitrificantes que existen en los suelos patagónicos (Acuña et al 2007), el desplazamiento en dirección al ánodo se debe a electromigración. Schmidt et al (2007) concluye que la electrorremediación es una buena técnica para introducir nitrógeno al suelo usando nitrato que posee una mejor movilización que el amonio, ya que este disminuyo por movilización y por reacciones químicas en el cátodo.

Los sistemas de electrobiorremediación tienen el problema de mantener constante la humedad, que se modifica por electroendoosmosis que arrastra hidrocarburos, concentrándolos en el cátodo. La disminución de la humedad de las cubas también puede deberse a factores de calentamiento del sistema o al desarrollo de reacciones químicas exotérmicas (Shapiro y Probstein 1993), en este trabajo la temperatura del suelo en la cuba se mantuvo en $24,3 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo el ensayo, se observó una diferencia de $0,4^\circ\text{C}$ entre el ánodo y el cátodo, la temperatura ambiental $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Los electrodos usados fueron de material inerte por lo que los cambios en la humedad de las cubas se debieron principalmente a flujo electroosmótico, estando en concordancia con Schmidt et al 2007 que trabajo con un voltaje menor, $0,3 \text{ V cm}^{-1}$.

El suelo patagónico utilizado poseía una degradación previa, ya que la muestra fue tomada de un landfarming de varios años de desarrollo. La utilización de corriente aumento la degradación de los hidrocarburos presentes que se caracterizan por una marcada recalcitrancia al no ser degradados en todo el tiempo que se desarrolló el landfarming.

Cuadro I. Valores de los analitos nitratos, fosfatos, nitrito y amonio. De las cubas.

	inicial	Ánodo	Centro	Cátodo
Nitrato (ppm)	407	1605	55.9	479
Fosfato (ppm)	32.9	316	114	1677
Nitrito (ppm)	4.04	6.5	0.96	4.1
Amonio (ppm)	151.1	10.1	7.6	56.7
pH	7.96	7.1	8.1	8.6
TPH %	4,22	3	2,88	3
R2A (UFCg ⁻¹)	$2,66 \times 10^{08}$	$8,80 \times 10^{07}$	$5,80 \times 10^{07}$	$1,01 \times 10^{08}$
MBM-PGO (UFCg ⁻¹)	$1,12 \times 10^{08}$	$1,45 \times 10^{08}$	$9,50 \times 10^{07}$	$1,55 \times 10^{08}$

Ver relación hidrocarburo nitrato fosfato

HIDROCARBUROS ANALIZADOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.

En la figura 4 se presentan los perfiles cromatográficos del petróleo tipo Escalante (cromatograma rojo), que fue el que produjo la contaminación del suelo, la composición del residuo después de un tratamiento de landfarming sin aplicar corriente y que es difícil o imposible de modificar si no se aplica otra tecnología (cromatograma azul) esta última muestra cumple con las normativas vigentes en cuanto a TPH.

La aplicación de electrobiorremediación produce la disminución de los hidrocarburos como puede observarse en la figura 5. El cromatograma amarillo corresponde al cromatograma a la iniciación del proceso, el verde al final del proceso en el cátodo, el rojo en el centro y el azul en el ánodo. En los tres últimos cromatogramas no se identificaron los picos de los hidrocarburos alifáticos y poliaromáticos que existían a la iniciación del proceso por lo que este tipo de tratamiento es exitoso cuando la biorremediación en cualquiera de sus métodos no puede disminuir los hidrocarburos poliaromáticos

Figura 4. Comparación de los perfiles cromatográficos del petróleo tipo Escalante (color rojo) que produjo la contaminación del suelo con el del residuo luego del tratamiento de landfarming sin aplicar corriente (color azul).

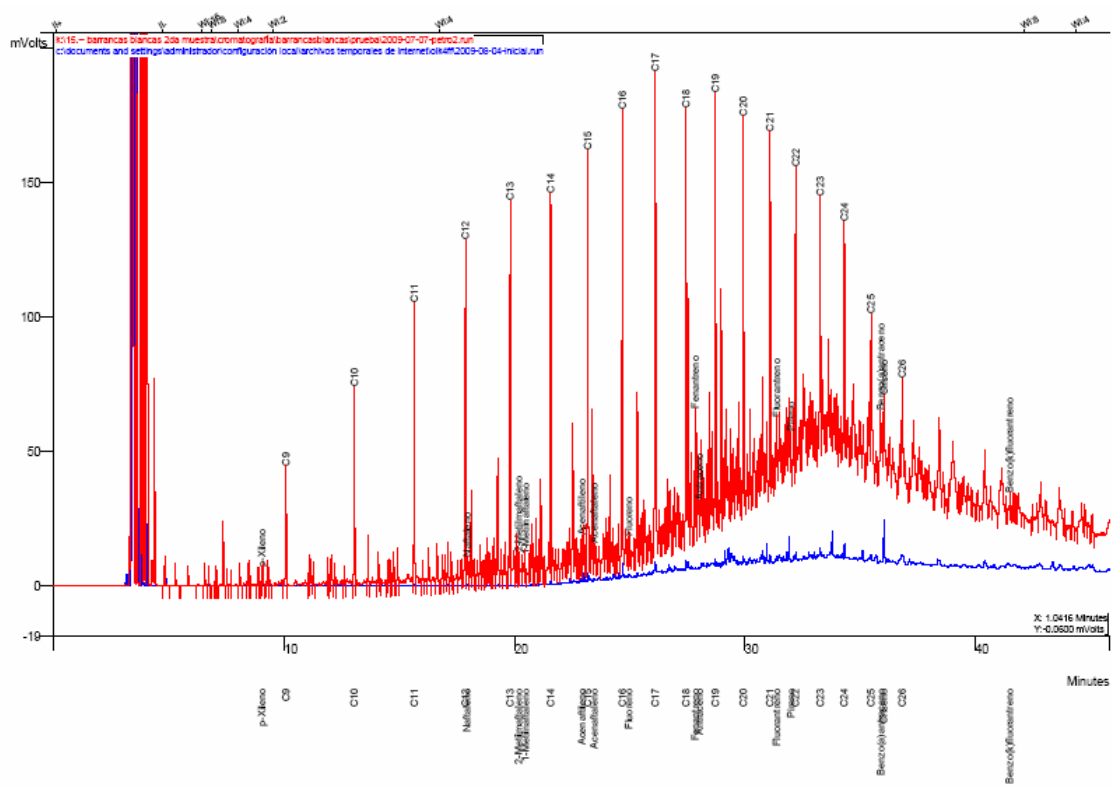
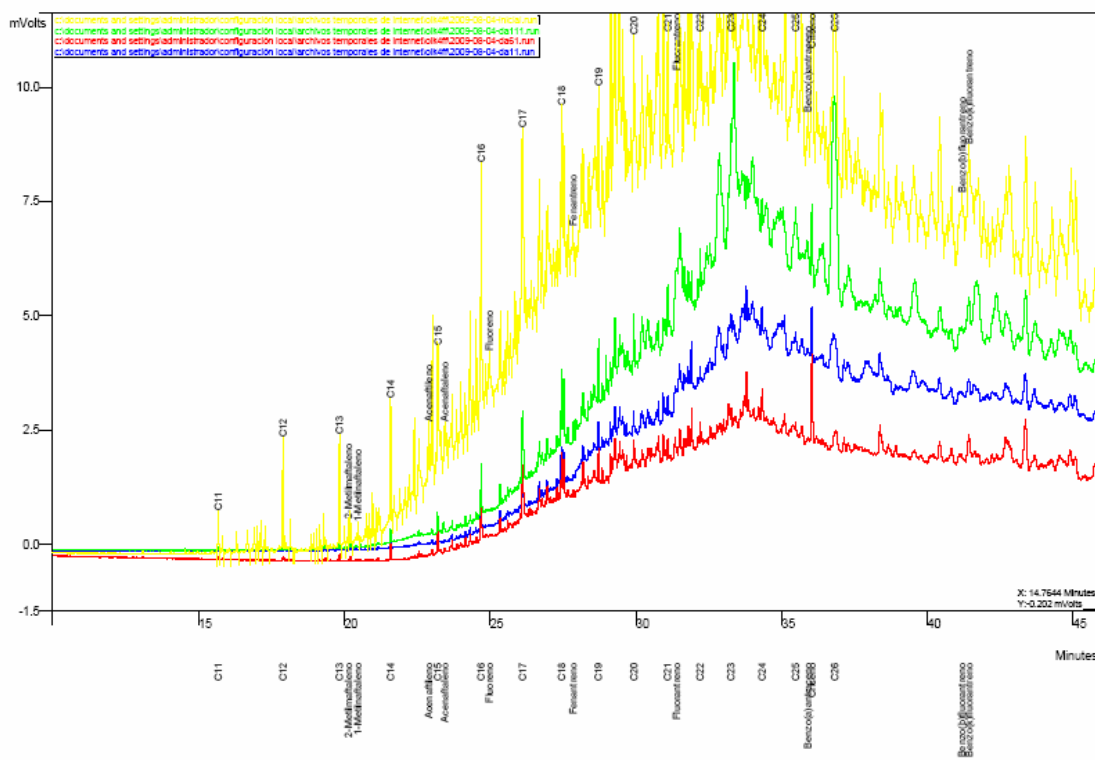


Figura 5. Comparación de los hidrocarburos iniciales del suelo (amarillo) con los finales en el ánodo (azul), centro (rojo) y en el cátodo (verde) luego de la electrobiorremediación.



Puentes salinos: la utilización de puentes salinos y $0,5\text{Vcm}^{-1}$ mantuvo el pH de la cuba en valores óptimos para el desarrollo bacteriano y la degradación de hidrocarburos para los 150 días en que se desarrolló la experiencia. El mantenimiento del pH en valores aptos para los microorganismos produjo que los valores de los recuentos bacterianos no presentaran modificaciones (ver cuadro I), en todos los casos la caída de un logaritmo está dentro del error del método. Estos puentes salinos tienen como único efecto secundario la liberación de fosfatos en el cátodo, lo que no es un inconveniente pues es un nutriente inorgánico bacteriano y las concentraciones alcanzadas son las que se usan en los medios de cultivo por lo que no resultan tóxicos para las bacterias.

Comunidades bacterianas cultivables que utilizan hidrocarburos

Durante las últimas décadas se realizaron diversos trabajos mostrando la factibilidad de movimiento de las bacterias en suelos arcillosos y en medios líquidos (De Flua 1997, Lee and Lee 2001, Wick et al 2004). Da Rocha et al 2009 trabajo con arcillas y esporas bacterianas, su publicación muestra que la electroforesis fue el fenómeno responsable de la migración de las esporas de *Bacillus* permitiendo la bioaumentación de las bacterias autóctonas.

El análisis de correspondencia de las cepas aisladas del ánodo, centro, cátodo y los dos blancos SN y SE muestra un desplazamiento inicial de la composición de la comunidad por el agregado de humedad, teniendo poca influencia el agregado de nutrientes (Figura 6) dado que existe proximidad entre las comunidades centro, SE y SN. La aplicación de corriente modifica en forma importante las comunidades. En la figura 7 se observa la morfología de las colonias bacterianas del suelo de la cuba presentando el cátodo un predominio de *Micrococcus luteus* (Cuadro II), que posee un alto valor de movilidad electroforética -1,26 (Bayer and Sloyer 1990) en menor cantidad se halló en el centro de la cuba y en los controles con y sin nutrientes y con humedad. *Arthrobacter* se encontró en el ánodo, coincidiendo con Lear et al 2004.

El ánodo presentó una diversidad diferente sin presentar un predominio como lo fue el del cátodo siendo similar a las cepas identificadas en el inicio. Las cepas gram negativas se encontraron en un mayor porcentaje en el ánodo, mientras que las cepas gram positivas se encuentran en un mayor porcentaje en el centro y cátodo como también en los controles de nutrientes y el control de la humedad. De la observación de la distribución espacial de las bacterias en el análisis de correspondencia podemos inferir que los mayores cambios en la estructura de las comunidades se inducen por la corriente eléctrica y por el agregado de humedad.

Figura 6. Diferencias de las comunidades cultivables inicial, ánodo, cátodo con agregado de humedad y nutrientes y con humedad solamente.

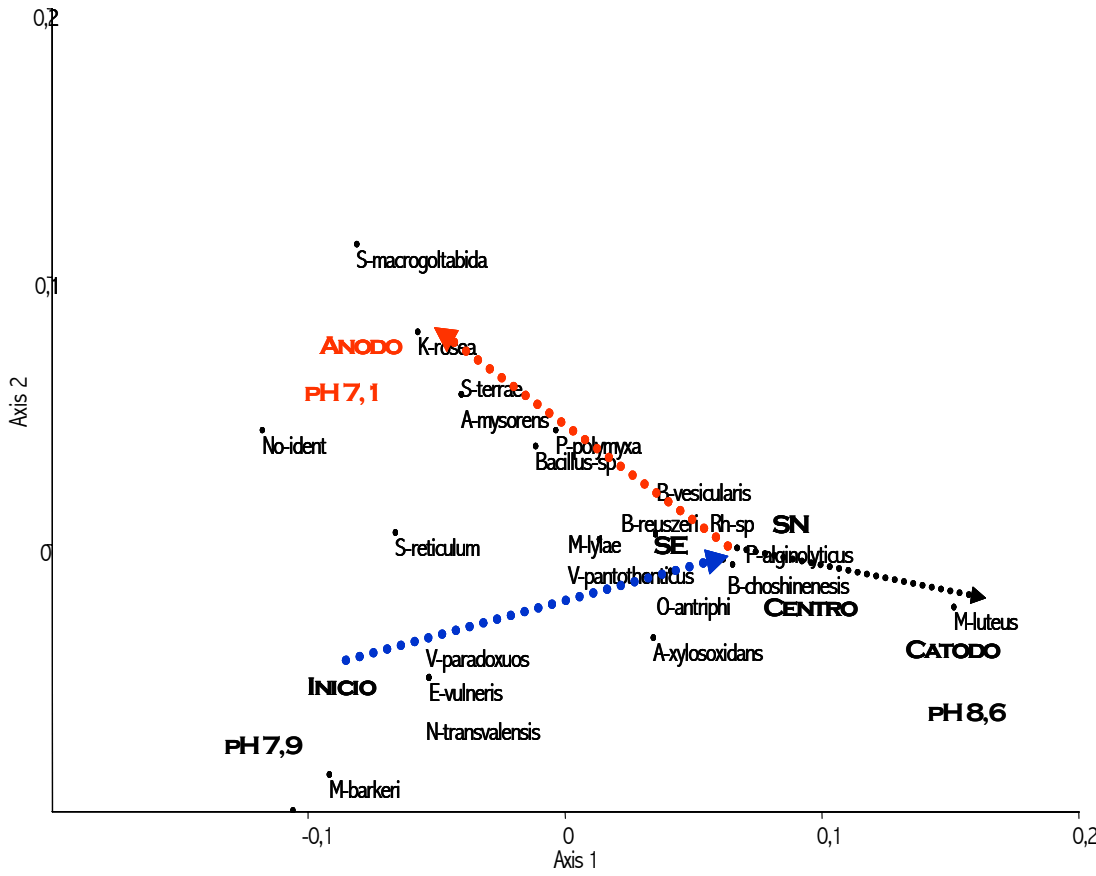
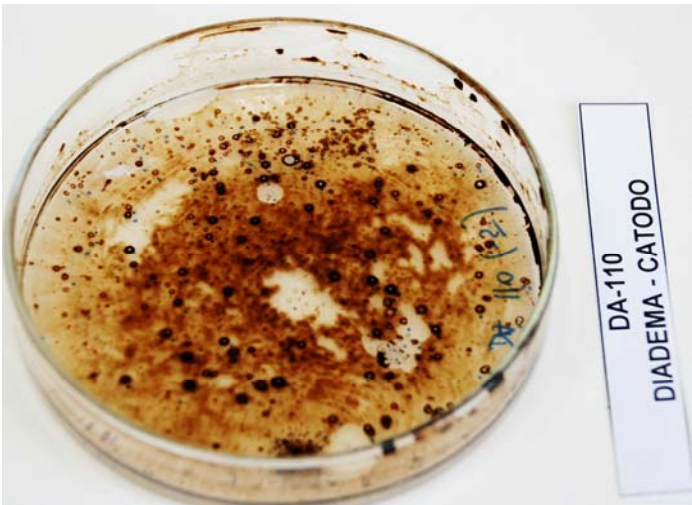
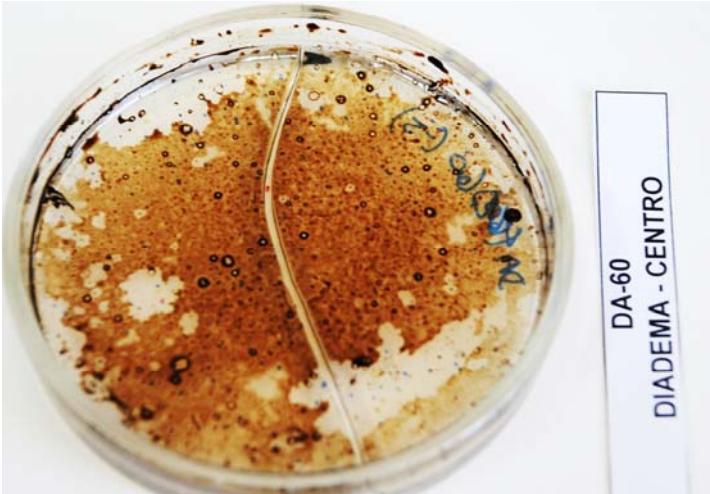


Figura 7. Morfología las colonias de los microorganismo pertenecientes al suelo de la cuba.



Cuadro II. Composición de las comunidad bacteriana identificada del suelo expuesta en los diferentes partes de la cuba y tratamientos.

Cepa	Inicio	Ánodo	Centro	Cátodo	SE	SN
<i>Achromobacter xylosoxidans denitrificans</i>	1		2	2		
<i>Arthrobacter mysorens</i>		1				
<i>Brevibacillus choshinensis</i>			2	1	1	1
<i>Brevibacillus reuszeri</i>						1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>						1
<i>Bacillus</i> sp		1	1			
<i>Escherichia vulneris</i>	1					
<i>Kocuria rosea</i>		1				
<i>Microbacterium barkeri</i>	3					
<i>Micrococcus luteus</i>			5	11	5	3
<i>Micrococcus lylae</i>					1	
No identificada	6	10	1	1	5	
<i>Nocardia transvalensis</i>	1					
<i>Ochrobactrum antri</i> phi				1		
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>				2	1	1
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		1				1
<i>Rhodococcus</i> sp						1
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>		4				
<i>Sphingomonas terrae</i>		2				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4					
<i>Streptovorticillium reticulum</i> (not valid 48h yeast malt agar)	1	1				
<i>Variovorax paradoxus</i> (alcaligenes paradoxus)	1					
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>					1	
Total	18	21	11	18	13	9

Conclusiones

Es un método aplicable a suelos que ya poseen una degradación previa. Elimina hidrocarburos aromáticos y disminuye los hidrocarburos polares. El uso de puentes salinos de buffer fosfato mantuvo el pH del suelo y valores aceptables de nutrientes que favorecen la degradación. Por los costos que el sistema posee, se recomendaría esta técnica para los suelos patagónicos después de una degradación previa en la que no se alcancen los niveles fijados por la reglamentación.

Bibliografía.

Acar Y.B., Gale R.J., Alshawabkeh A.N, Marks R.E., Puppala S., Bricka M and. Parker R. (1995) Electrokinetic remediation: basics and technology status, J. Hazard. Mater. 40, 117–137

- Acar YB, Alshawabkeh AN. Principles of electrokinetic remediation. *Environ Sci Technol* 1993;27 13 :2638_2647.
- Acuña A.J., Pucci O.H., y Pucci G.N. (2008). Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la patagonia argentina. *Ecosistema* 17, 85-93.
- API (American petroleum institute) www.iapg.org.ar
- Baraud F, Fourcade MC, Tellier S, Astruc M. Modelling of decontamination rate in an electrokinetic soil processing. *Int J Environ Anal Chem* 1998;68:105_121.
- Bayer M.E. and Sloyer J.L. (1990). The electrophoretic mobility of gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *Journal of general microbiology* 136, 867-874
- Benazon N. Soil remediation. *Hazard Mater Manage* 1999;October_November.
- Da Rocha Ulisses Nunes, Marcos Rogério Tótolaa*, Denise Maria Mano Pessoa, José Tavares Araruna Juniorb, Julio César Lima Neves a, Arnaldo Chaer Borges a Mobilisation of bacteria in a fine-grained residual soil by electrophoresis *Journal of Hazardous Materials* 161 (2009) 485–491
- DE LA Rosa-Pérez D., Teutli-León M.M.M. y Ramirez-Islas M.E. (2007). Electrorremediación de suelos contaminados , una revisión técnica para su aplicación en campo. *Rev. Int. Contam. Ambient* 23,129-138
- DeFlaun M.F. and C.W. Condee, (1997), Electrokinetic transport of bacteria, *J. Hazard. Mater.* 55 pp. 263–277.
- DeFlaun Mary F., Charles W. Condee. (1997) Electrokinetic transport of bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 55 263-277
- EPA (Environmental protection agency) www.epa.gov
- Fontes D.E., Mills A.L., Hornberger G.M. and Herman J.S.(1991) Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2473–2481
- Gent D. y Bricka M. (2001). Electrokinetic movement of biological amendments through natural soils to enhance *in-situ* bioremediation. En: *Bioremediation of Inorganic Compounds*. (A. Leeson, B.M. Peyton, y J.L. Means, Eds.) The Sixth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. San Diego, California. pp: 241-248
- Gootaek L, Heemyoung L and Sangmo L.(2006). Electrokinetically enhanced transport of organic and inorganic phosphorus in a low permeability soil. *Geoscience Journal* 10, 85-89
- Kim S.O. y Kim K.W. (2001). Monitoring of electrokinetic removal of heavy metals in tailing-soils using sequential extraction analysis. *J. Hazard. Mater.* 85, 195-211.
- Laursen S. (1997). Laboratory investigation of electroosmosis in bentonites and natural clays. *Can. Geotec. J.* 43, 664–671.
- Laursen S. (1997). Laboratory investigation of electroosmosis in bentonites and natural clays. *Can. Geotec. J.* 43, 664–671.
- Lear G., Harbottle M.J., Van Der Gast C.J., Jackman S.A. Knowles C.J, Sills G. and Thompson I.P. (2004). The effect of electrokinetics on soil microbial communities, *Soil Biol. Biochem.* 36, 1751–1760.
- Lee, H.-S., Lee, K., (2001). Bioremediation of diesel-contaminated soil by bacterial cells transported by electrokinetics. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11, 1038e1045.
- Lindgren E.R., Mattson E.D. y Kosak M.W. (1994). Electrokinetic remediation of unsaturated soils. *American Chemical Society Symposium Series* 554, 33–50.
- Maini G. y Sharman A.K. (1999). Enhanced removal of copper from contaminated silt soil using bioelectrokinetics. En: *Bioremediation of metals and inorganic compounds*. (A. Leeson y B.C. Alleman, Eds.). Battelle press, EUA, Columbus. pp. 127-137.
- Marks R.E., Acar Y.B. y Gale R.J. (1994). In situ remediation of contaminated soils containing hazardous mixed wastes by bio-electrokinetic remediation and other competitive technologies. En: *Remediation of*

- hazardous waste contaminated soil*. (D.L Wise y D. Trantolo, Eds.) Marcel Dekker, Nueva York. pp. 405-436.
- Martínez Gilbon A.J. (2001). Electroremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, México D.F., 47 p.
- Molina Díaz G.E. Palestina Caliz V. y Piedras Pérez J.A. (2004). Recuperación electrocinética de hidrocarburos sorbidos en suelos contaminados. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, México D.F., 85 p.
- Muralidhara H.S., Jirgis B.F., Stulen F.B., Wickramanayake G.B., Gill A. y Hinchee R.E. (1990). Development of electro-acoustic soil decontamination process for *insitu* applications. Report No. EPA/540/5-90/004, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.
- Niqui –Arroyo J, Bueno-Montes M, Posada Baquero R Ortega-Calvo JJ. (2006). Electrokinetic enhancement of phenanthrene biodegradation in creosote – polluted clay soil. *Environmental pollution* 142:326-332.
- Ravera M., Ciccarelli C., Gastaldi D., Rinaudo C., Castelli C. y Osella D. (2006). An experiment in the electrokinetic removal of copper from soil contaminated by the brass industry. *Chemosphere* 63, 950-955.
- Reasoner D.J., Geldreich E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacterial from potable water. *Appl. Environ. Microbiol* 49:1-7.
- Reddy K, Chinthamreddy S. Electrokinetic remediation of heavy metal-contaminated soils under reducing environments. *Waste Manage* 1999;19:269_282.
- Reddy K, Donahue M, Sasaoka R. (1999); Preliminary assessment of electrokinetic remediation of soil and sludge contaminated with mixed waste. *Air Waste Manage Assoc* 49:823_830.
- Reddy K, Parupudi US. (1997). Effects of soil composition on the removal of chromium by electrokinetics. *J Hazard Mater*;55:135_15
- Reddy K.R., Xu C.Y. y Chinthamreddy S. (2001). Assessment of electrokinetic removal of heavy metals from soils by sequential extraction analysis. *J. Hazard. Mater.* 84, 279-96.
- Schmidt CAB; Barbosa MC and Almeida MSS. (2007). A laboratory feasibility study on electrokinetic injection of nutrients on an organic, tropical, clayey soil. *Journal of Hazardous Material* 143,655-661
- Shapiro A.P. y Probstein R.F. (1993). Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. *Environ. Sci. Technol.* 27, 283–291.
- Shapiro A.P. y Probstein R.F. (1993). Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. *Environ. Sci. Technol.* 27, 283-291.
- Sims RC (1990). *Soil Remediation Techniques at Uncontrolled Hazardous Waste Sites*. Utah State University;704_732.
- Sogorka DB, Gabert H, Sogorka BJ. (1998). Emerging technologies for soils contaminated with metals electrokinetic remediation. *Hazard Ind Wastes*; 30:673_685.
- Sposito G. (1989). *The chemistry of soils*. Oxford University Press, Nueva York, 304 p.
- Standard Methods for the examinations of Water and Wastewater, 1992. 18th edition. Parte 2320. Método B.
- Suer P., Gitye K. y Allard B. (2003). Speciation and transport of heavy metals and macroelements during electroremediation. *Environ. Sci. Technol.* 37, 177-181.
- Suni S, Romantschuk M (2004), Mobilisation of bacteria in soils by electro-osmosis *FEMS Microbiology Ecology* 49, 51–57
- Thevanayagam and Rishindran, (1998) S. Thevanayagam and T. Rishindran, Injection of nutrients and TEAs in clayey soils using electrokinetics, *ASCE J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 124, 330–338
- Turer D. y Genc A. (2005). Assessing effect of electrode configuration on the efficiency of electrokinetic remediation by sequential extraction analysis. *J. Hazard. Mater.* 119, 167-174.
- van Cauwenberghe L. (1997). *Electrokinetics: Technology Overview Report*. Groundwater Remediation Technologies Analysis Centre;1_17.

- Virkutyte J., Sillanpää M. y Latostenmaa P. (2002). Electrokinetic soil remediation - Critical overview. *The Sci. Tot. Environ.* 289, 97-121.
- Wick L, Shi L and Harms H (2006) Electro-bioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions. *Electrochimical acta.* 52: 3441-3448
- Wick L., Mattle P., Wattiau P., Harms H. (2004). Electrokinetic Transport of PAH-Degrading Bacteria in Model Aquifers and Soil *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 4596-4602.
- Yeung, A.T. (1990). Coupled flow equations for water electricity and ionic contaminants through clayey under hydraulic, electrical and chemical gradients. *J. Non-Equilibrium Thermod.* 15, 247-267.
- Zelina JP, Rusling JF. (1999) Electrochemical remediation of soils, :532_539