

Evaluación del Contenido de Diésel Presente en un Medio de Cultivo

O. Pindado Jiménez
R. M.^a Pérez Pastor



Evaluación del Contenido de Diésel Presente en un Medio de Cultivo

O. Pindado Jiménez
R. M.^a Pérez Pastor

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M-26385-2011
ISSN: 1135-9420
NIPO: 058-17-011-7

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S54

DIESEL FUELS; EVALUATION; HYDROCARBONS; EXPERIMENTAL DATA;
CULTIVATION; ENVIRONMENTAL IMPACTS

Evaluación del Contenido de Diésel Presente en un Medio de Cultivo

Pindado Jiménez, O.; Pérez Pastor, R. M.^a

36 pp. 18 refs. 16 figs. 20 tablas

Resumen:

Se presenta la optimización de un método analítico para determinar el contenido de diésel y la composición de las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en un medio de cultivo de microorganismos. Como parte de los ensayos de laboratorio, el análisis de estos parámetros es fundamental e indispensable para conocer el grado de descontaminación que producen diferentes microorganismos para eliminar diésel en procesos de biorremediación. El análisis de la matriz involucra etapas de extracción y fraccionamiento basadas en la extracción en fase sólida y finalmente el análisis cromatográfico con detector de ionización de llama. Se han empleado métodos de diseño experimental y el procedimiento ha sido validado.

Evaluation of Diesel Content in a Growth Medium

Pindado Jiménez, O.; Pérez Pastor, R. M.^a

36 pp. 18 refs. 16 figs. 20 tables

Abstract:

Analytical method optimization to analyze diesel and several aliphatic and aromatic fractions present in a growth medium of microorganisms are showed. As a part of laboratory assays, analyzing these parameters is fundamental and indispensable to know decontamination accomplished by different microorganisms to eliminate diesel in bioremediation processes. Analysis of the matrix involves extraction and clean up steps based on solid phase extraction and finally a chromatograph analysis with flame ion detector. It has used design methods and the procedure has been validated.

CONTENIDO

SIGLAS Y ACRÓNIMOS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	9
2.1. INSTRUMENTACIÓN.....	9
2.2. MATERIALES.....	9
2.3. PATRONES, DISOLVENTES Y GASES.....	9
2.4. PREPARACIÓN DE PATRONES Y REACTIVOS.....	10
2.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.	11
2.5.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	11
2.5.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y AROMÁTICOS.	11
2.5.3. DEFINICIÓN DE LOS RANGOS DE HIDROCARBUROS.	12
2.5.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS RANGOS DE HIDROCARBUROS.	13
2.5.5. CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES EN LAS MUESTRAS.....	16
3. RESULTADOS.....	17
3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	17
3.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL: MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	17
3.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL: MÉTODO DE LAVADO.	20
3.2. MÉTODO DE ANÁLISIS.....	23
3.3. CAPACIDAD DE CARTUCHOS SEP-PAK PARA EL DIÉSEL.....	26
3.4. FRACCIONAMIENTO.....	28
3.5. VALIDACIÓN	29
3.5.1. LINEALIDAD.....	29
3.5.2. RECUPERACIÓN.	30
3.5.3. PRECISIÓN.....	31
4. CONCLUSIONES.	33
5. REFERENCIAS	35

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

B(a)A: Benzo (a) antraceno.

B(a)Py: Benzo (a) pireno.

B(b)F: Benzo (b) fluoranteno.

B(ghi)Pe: Benzo (ghi) perileno.

B(k)F: Benzo (k) fluoranteno.

DBA: Dibenzo (ah) antraceno.

DCM: Diclorometano.

EC: Número equivalente de carbono.

EPH: Hidrocarburos extraíbles del petróleo.

FID: Detector de ionización de llama.

GC: Cromatógrafo de gases.

InPy: Indeno (123-cd) pireno.

PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

SPE: Extracción en fase sólida.

TPH: Hidrocarburos totales del petróleo.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de los derivados del petróleo está muy extendido en la sociedad moderna, bien como materia prima para síntesis de nuevos materiales o como combustible para la producción de energía. Uno de los derivados del petróleo más empleados es el diésel, debido a su utilización como combustible en calefacciones y en motores de vehículos. El uso de diésel como combustible genera graves problemas de contaminación atmosférica, principalmente por partículas y óxidos de nitrógeno [1, 2]. A pesar de que actualmente esta es una de las mayores preocupaciones de la utilización del diésel, el problema que genera su uso no queda reducido únicamente en la atmósfera, sino que de hecho es considerado uno de los contaminantes más comunes en los suelos [3-5].

El diésel es una mezcla de hidrocarburos con una densidad ligeramente superior a la gasolina, debido a que el diésel está formado por una mezcla de hidrocarburos más pesados que las gasolinas. El diésel suele estar formado por una mezcla de hidrocarburos con un número de átomos de carbono que oscila entre 10 – 15. En cuanto a su composición, suele estar formado por un 75 % de hidrocarburos saturados y un 25 % de hidrocarburos aromáticos.

Debido a que el diésel es una mezcla compleja de diferentes compuestos, las técnicas cromatográficas actuales no disponen de la suficiente resolución y por lo tanto no son capaces de identificar completamente cada uno de sus componentes. Es por ello que se definen diferentes parámetros para expresar la concentración total de hidrocarburos en matrices de interés medioambiental. Entre los parámetros más empleados cabe destacar los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) o los hidrocarburos extraíbles del petróleo (EPH).

En los últimos años se están ampliando los estudios de TPH para poder considerar el comportamiento, la evolución en el medioambiente o la toxicidad mediante procesos de fraccionamiento. Los hidrocarburos tienen propiedades fisicoquímicas similares, por lo que pueden ser clasificados en grupos o fracciones [6]. El método de clasificación más empleado se basa en el número equivalente de carbono (EC) definido por la “*Total Petroleum Hydrocarbons Criteria Working Group (TPHCWG)*”. Este método referencia los compuestos aromáticos y alifáticos en función de sus puntos de ebullición normalizados con respecto a una especie que se toma de referencia: el *n*-hexano [7, 8].

Una de las alternativas más empleadas para la recuperación de suelos contaminados es la biorremediación. Este proceso se basa en la utilización de microorganismos, principalmente bacterias debido a su elevada capacidad metabólica, para degradar los hidrocarburos presentes en el suelo y conseguir eliminarlos completamente o producir la biotransformación a especies más biodisponibles y por tanto menos peligrosas para el medioambiente. Estas alternativas han sido empleadas con éxito en numerosos emplazamientos [9-15].

Una de las líneas de investigación más importantes en el campo de la biorremediación se centra en estudiar cómo actúan los microorganismos. Dentro del empleo de bacterias para degradar

hidrocarburos, es muy interesante conocer que fracciones de hidrocarburos son más susceptibles a ser degradadas por cada microorganismo, estudiando las biotransformaciones que se produzcan o bien evitando la generación de sustancias recalcitrantes.

Estos estudios requieren el desarrollo de nuevas metodologías analíticas capaces de determinar los contenidos de diésel presentes a lo largo de los ensayos de laboratorio que se realizan en medios de cultivo de microorganismos controlados. Un medio de cultivo de microorganismos debe poseer todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos presentes. El medio de cultivo empleado a lo largo de este estudio se denomina medio de cultivo mínimo, ya que dispone de la menor cantidad de nutrientes necesario. Está formado por un medio acuoso con una mezcla de sales inorgánicas que proporcionen los elementos necesarios para la vida de los microorganismos, un extracto de levadura (0.005 %) y una fuente de carbono para el crecimiento microbiano que en este caso particular es el diésel (1 %). Esta nueva matriz es un reto analítico, y las metodologías actuales para determinar hidrocarburos deben ser modificadas [16, 17].

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un método de análisis capaz de determinar el contenido de diésel en un medio de cultivo con microorganismos. Se deberá determinar cuantitativamente que cadenas de hidrocarburos son degradadas en mayor medida, minimizando los problemas analíticos que pueda generar la matriz. Para realizar esta optimización, se partirá de métodos de análisis validados [18] y se empleará el diseño experimental para optimizar las variables más críticas. El último paso en el desarrollo de la metodología es realizar el estudio de validación con el fin de demostrar su viabilidad. La validación consiste en la determinación de algunos de los principales parámetros de calidad analíticos. En este estudio se determinarán la linealidad, la precisión intermedia, repetitividad y recuperación, así como la capacidad de los cartuchos SPE.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN.

- *Cromatógrafo de gases Agilent 7820A con detector FID e inyector automático.*
- *Distribuidor de vacío para SPE de 12 puertos [Agilent].*
- *Bomba de vacío [Vacuubrand].*
- *Vitrina.*
- *Centrífuga [Ortoalresa digito 21].*
- *Agitador Vortex.*
- *Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno.*

2.2. MATERIALES.

- *Columna cromatográfica de sílice fundida HP5 (30 m longitud; 0,32 mm diámetro interno; 0,25 μ m fase estacionaria). N° serie: USA540816H.*
- *Cartuchos de fase normal Isolute sorbent EPH (25 mL / 5 g).*
- *Cartuchos de fase inversa Waters Sep-pak tC_{18} (6 mL / 1 g).*
- *Jeringas de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2500 μ L [Hamilton y SGE].*
- *Probetas de 10, 25, 50 y 100 mL.*
- *Pipetas de 50 y 100 mL.*
- *Vasos de precipitados.*
- *Tubos de centrifuga de 50 y 100 mL.*
- *Pipetas Pasteur.*
- *Viales de vidrio de 1, 5, 10 y 20 mL.*
- *Tubos de ensayo.*
- *Adaptadores y tuberías de plástico.*
- *Soportes, nuez y pinza de laboratorio.*

2.3. PATRONES, DISOLVENTES Y GASES.

- *Medio de cultivo mínimo.*

- *Diésel.*
- *Patrón de hidrocarburos alifáticos. DRH-FTRPH-SET: disolución de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en hexano de n-alcenos comprendidos entre octano y el tetracontano, más fitano y pristano [Sigma Aldrich].*
- *Patrón de hidrocarburos aromáticos. PAH-Mix9: disolución de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en ciclohexano [Dr. Ehrenstorfer GMBH].*
- *Acetona, hexano, diclorometano y metanol de calidad cromatográfica [Aldrich].*
- *Agua desionizada.*
- *Sulfato de sodio anhidro [Merck].*
- *Gas helio (N50 / B50) como gas portador, gas hidrógeno (N50 / B50) como gas de combustión, gas aire (N50 / B50) como gas de mezcla y gas nitrógeno (N50 / B50) como gas “make up” y para la concentración de los extractos.*

2.4. PREPARACIÓN DE PATRONES Y REACTIVOS.

A partir del patrón comercial de hidrocarburos alifáticos de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se preparan por triplicado las disoluciones de calibrado. Los volúmenes empleados están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1: Disoluciones de calibrado de hidrocarburos alifáticos.

Disolución	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Patrón (impar) 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (μL)	Patrón (par) 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (μL)	Volumen hexano
1	200	40	40	20
2	150	30	30	40
3	100	20	20	60
4	50	10	10	80
5	25		25*	75
6	5		5*	95

* Patrón 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

A partir del patrón comercial de PAHs de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se preparan por triplicado las disoluciones de calibrado. Los volúmenes empleados están recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2: Disoluciones de calibrado de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Disolución	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Patrón 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (μL)	Volumen hexano (μL)
1	100	100	-
2	80	80	20
3	60	60	40
4	40	40	60
5	20	20	80
6	1	5*	95

* Patrón 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

Las muestras serán tratadas con el fin de disponer el diésel en un medio apolar, como es el hexano, para realizar el análisis cromatográfico.

2.5.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN.

Para el análisis del diésel se definen las condiciones óptimas de operación. En la Tabla 3 se presentan las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis.

Tabla 3: Condiciones de operación del GC/FID.

INYECTOR			
Liner: 5062-3587	Modo Splitless	Temperatura: 250 °C	Presión: 10.744 psi
Volumen inyectado: 3 µL muestra + 0,2 µL aire			
HORNO			
Columna: HP5 (30 x 0,32 x 0,25)		Flujo: 2 mL min ⁻¹	
(1)		Temp. 80 °C	Tiempo 0 min.
(2)	Rampa 7 °C min ⁻¹	Temp. 200 °C	Tiempo 0 min.
(3)	Rampa 11 °C min ⁻¹	Temp. 300 °C	Tiempo 17 min.
DETECTOR			
Temperatura: 325 °C		Frecuencia: 20 Hz	
Relación gases	H ₂ : 30 mL min ⁻¹	Aire: 400 mL min ⁻¹	N ₂ : 25 mL min ⁻¹

2.5.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y AROMÁTICOS.

La identificación de los compuestos alifáticos y aromáticos presentes en el diésel se realiza a través de los tiempos de retención. Para establecer precisamente los tiempos de retención de cada compuesto se deben realizar varias inyecciones a lo largo de un periodo de 48 horas. Se define la ventana de tiempo de retención como el tiempo de retención promedio más menos tres veces la desviación estándar. Los tiempos de retención para los compuestos estudiados en el momento de la redacción de este informe están recogidos en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Tiempo de retención de los hidrocarburos alifáticos ($t_R \pm 3s$)

Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)
C ₁₁ H ₂₄	4,65 ± 0,02	C ₂₀ H ₄₂	18,55 ± 0,04	C ₃₁ H ₆₄	27,09 ± 0,04
C ₁₂ H ₂₆	6,17 ± 0,02	C ₂₁ H ₄₄	19,65 ± 0,04	C ₃₂ H ₆₆	27,83 ± 0,05
C ₁₃ H ₂₈	7,83 ± 0,03	C ₂₂ H ₄₆	20,63 ± 0,03	C ₃₃ H ₆₈	28,68 ± 0,06
C ₁₄ H ₃₀	9,53 ± 0,03	C ₂₃ H ₄₈	21,52 ± 0,03	C ₃₄ H ₇₀	29,68 ± 0,06
C ₁₅ H ₃₂	11,20 ± 0,04	C ₂₄ H ₅₀	22,35 ± 0,03	C ₃₅ H ₇₂	30,86 ± 0,08
C ₁₆ H ₃₄	12,82 ± 0,04	C ₂₅ H ₅₂	23,11 ± 0,03	C ₃₆ H ₇₄	32,26 ± 0,10
C ₁₇ H ₃₆	14,38 ± 0,04	C ₂₆ H ₅₄	23,84 ± 0,03	C ₃₇ H ₇₆	33,94 ± 0,10
Pristano	14,48 ± 0,04	C ₂₇ H ₅₆	24,53 ± 0,03	C ₃₈ H ₇₈	35,96 ± 0,10
C ₁₈ H ₃₈	15,87 ± 0,04	C ₂₈ H ₅₈	25,19 ± 0,03	C ₃₉ H ₈₀	38,40 ± 0,12
Fitano	16,01 ± 0,05	C ₂₉ H ₆₀	25,82 ± 0,03	C ₄₀ H ₈₂	41,36 ± 0,15
C ₁₉ H ₄₀	17,29 ± 0,04	C ₃₀ H ₆₂	26,43 ± 0,03		

Tabla 5: Tiempo de retención de los hidrocarburos aromáticos policíclicos ($t_R \pm 3s$)

Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)
Naftaleno	$6,08 \pm 0,12$	Fluoranteno	$19,34 \pm 0,11$	B(a)Py	$25,82 \pm 0,13$
Acenaftileno	$10,48 \pm 0,09$	Pireno	$19,91 \pm 0,11$	InPy	$27,81 \pm 0,36$
Acenafteno	$11,07 \pm 0,10$	B(a)A	$22,79 \pm 0,34$	DBA	$28,11 \pm 0,24$
Fluoreno	$12,66 \pm 0,10$	Criseno	$22,97 \pm 0,10$	B(ghi)Pe	$28,50 \pm 0,36$
Fenantreno	$15,63 \pm 0,31$	B(b)F	$25,06 \pm 0,28$		
Antraceno	$15,80 \pm 0,16$	B(k)F	$25,23 \pm 0,06$		

2.5.3. DEFINICIÓN DE LOS RANGOS DE HIDROCARBUROS.

Se definen los rangos de hidrocarburos alifáticos en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática. En la Tabla 6 se definen los 5 rangos de hidrocarburos alifáticos. Cada rango comienza 0,1 minutos antes de la elución del primer hidrocarburo del rango y termina 0,1 antes de la elución del primer hidrocarburo de siguiente rango.

Tabla 6: Definición de los rangos de hidrocarburos alifáticos.

Rango hidrocarburos alifáticos	Tiempo de inicio (min)	Tiempo de finalización (min)
$>C_{10} - C_{12}$	4,2	7,0
$>C_{12} - C_{16}$	7,0	13,5
$>C_{16} - C_{21}$	13,5	20,2
$>C_{21} - C_{35}$	20,2	31,0
$>C_{35}$	31,0	43,23

Para definir los rangos de hidrocarburos aromáticos se emplea el número equivalente de carbono. En la Tabla 7 se presentan los resultados para los hidrocarburos aromáticos.

Tabla 7: Número equivalente de carbono de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

PAHs	P.E. ($^{\circ}C$)*	Nº Carbono	EC	PAHs	P.E. ($^{\circ}C$)*	Nº Carbono	EC
Naftaleno	218	10	11,69	B(a)A	435	18	26,37
Acenaftileno	270	12	15,06	Criseno	448	18	27,41
Acenafteno	277,5	12	15,50	B(b)F	481	20	30,14
Fluoreno	295	13	16,55	B(k)F	481	20	30,14
Fenantreno	339	14	19,36	B(a)Py	495	20	31,34
Antraceno	340	14	19,43	InPy	536	22	35,01
Fluoranteno	375	16	21,85	DBA	524	22	33,92
Pireno	360	16	20,80	B(ghi)Pe	525	22	34,01

* P.E: Punto de ebullición.

Los rangos de hidrocarburos aromáticos definidos en función del EC están recogidos en la Tabla 8. Al igual que los hidrocarburos alifáticos, cada rango comienza 0,1 minutos antes de la elución del primer PAHs del rango y termina 0,1 antes de la elución del primer PAHs de siguiente rango.

Tabla 8: Definición de los rangos de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Rango hidrocarburos aromáticos	Tiempo de inicio (min)	Tiempo de finalización (min)
>EC ₁₀ - EC ₁₂	4,0	6,5
>EC ₁₂ - EC ₁₆	6,5	12,5
>EC ₁₆ - EC ₂₁	12,5	20,0
>EC ₁₆ - EC ₃₅	20,0	27,0
>EC ₃₅	27,0	42,23

2.5.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS RANGOS DE HIDROCARBUROS.

La cuantificación de los rangos definidos se realiza utilizando factores de calibración. Esta técnica de calibración es la recomendada para determinar la relación entre la respuesta del detector FID y la concentración de las especies analizadas.

2.5.4.1. FACTORES DE CALIBRACIÓN PARA LOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS.

Se preparan 6 disoluciones de hidrocarburos alifáticos, según el punto 2.4 de este informe, y se analizan todas las disoluciones de calibración de acuerdo al punto 2.5.1. La disolución de concentración más baja y la disolución de concentración más elevada definen el intervalo de trabajo.

La expresión para calcular los factores de calibración de los 5 rangos de hidrocarburos alifáticos se muestra en la Ecuación 1:

$$FC[Rango] = \frac{\sum A}{C_t}$$

[Ecuación 1]

Donde A es el área del pico cromatográfico y C_t es la concentración total inyectada en cada rango. Esta no es igual en todos los rangos ya que cada uno de ellos incluye un número diferente de compuestos. En la Tabla 9 se resumen las concentraciones inyectadas en los diferentes rangos para cada disolución de calibración.

Tabla 9: Concentraciones de hidrocarburos alifáticos en las diferentes disolución de calibrado.

Rango	Concentración total de hidrocarburos inyectada (µg mL ⁻¹)						
	n	Dis. 1	Dis. 2	Dis. 3	Dis. 4	Dis. 5	Dis. 6
>C ₁₀ - C ₁₂	2	400	300	200	100	50	10
>C ₁₂ - C ₁₆	4	1800	600	400	200	00	20
>C ₁₆ - C ₂₁	7	1400	1050	700	350	175	35
>C ₂₁ - C ₃₅	14	2800	2100	1400	700	350	70
>C ₃₅	5	1000	750	500	250	125	25

El tipo de integración que se realiza es a “línea base”. El factor de calibración se calcula como la media de los factores de calibración obtenidos en las 6 disoluciones inyectadas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla 10.

Tabla 10: Factores de calibración de los rangos de hidrocarburos alifáticos.

Rango hidrocarburos alifáticos	FC	RDS (%)
>C ₁₀ - C ₁₂	507.241	3
>C ₁₂ - C ₁₆	507.809	6
>C ₁₆ - C ₂₁	509.975	5
>C ₂₁ - C ₃₅	487.752	5
>C ₃₅	333.553	15

La Figura 1 muestra el cromatograma de un patrón de hidrocarburos alifáticos de 50 µg mL⁻¹.

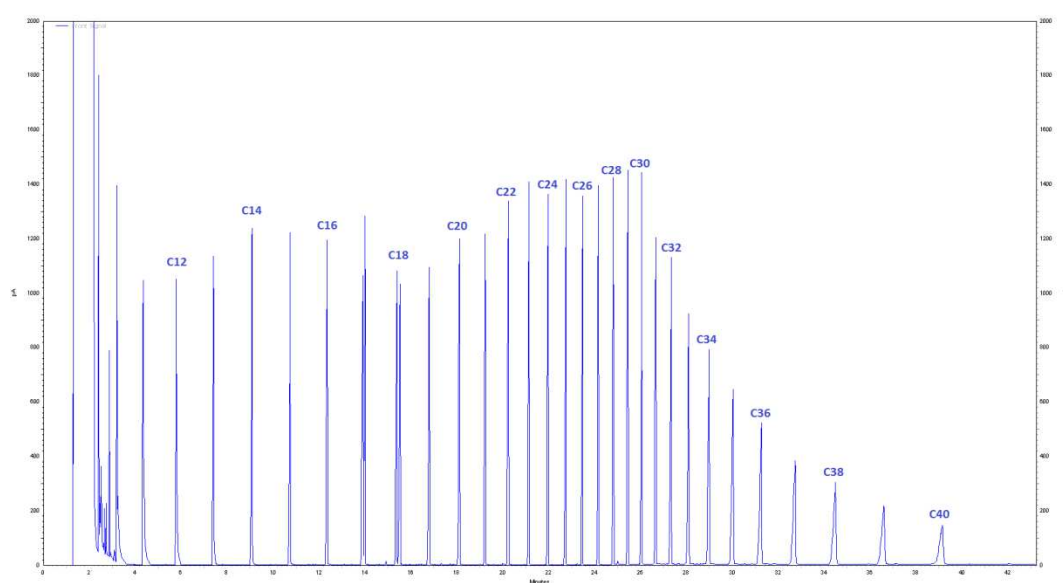


Figura 1: Cromatograma del patrón 4 de hidrocarburos alifáticos (50 ppm).

2.5.4.2. FACTORES DE CALIBRACIÓN PARA LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS.

Se preparan las 6 disoluciones de hidrocarburos aromáticos descritas en el punto 2.4. El intervalo de trabajo queda definido por la disolución de concentración más baja y la disolución de concentración más elevada.

La ecuación 1 recoge la expresión para calcular los factores de calibración de los 5 rangos de hidrocarburos aromáticos, mientras que en la Tabla 11 se resumen las concentraciones inyectadas en los diferentes rangos.

Tabla 11: Concentraciones de hidrocarburos aromáticos en las diferentes disoluciones de calibrado.

Rango	Concentración total de hidrocarburos inyectada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	n	Dis. 1	Dis. 2	Dis. 3	Dis. 4	Dis. 5	Dis. 6
$>\text{EC}_{10} - \text{EC}_{12}$	1	100	80	60	40	20	1
$>\text{EC}_{12} - \text{EC}_{16}$	2	200	160	120	80	40	2
$>\text{EC}_{16} - \text{EC}_{21}$	5	500	400	300	200	100	5
$>\text{EC}_{21} - \text{EC}_{35}$	5	500	400	300	200	100	5
$>\text{EC}_{35}$	3	300	240	180	120	60	3

La integración que se realiza es a “línea base”. El factor de calibración se calcula como la media de los factores de calibración obtenidos en las 6 disoluciones inyectadas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla 12.

Tabla 12: Factores de calibración de los rangos de hidrocarburos aromáticos.

Rango hidrocarburos aromáticos	FC	RDS (%)
$>\text{EC}_{10} - \text{EC}_{12}$	585.134	4
$>\text{EC}_{12} - \text{EC}_{16}$	591.750	5
$>\text{EC}_{16} - \text{EC}_{21}$	578.406	4
$>\text{EC}_{21} - \text{EC}_{35}$	569.131	4
$>\text{EC}_{35}$	420.488	3

La Figura 2 muestra el cromatograma de un patrón de hidrocarburos aromáticos de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

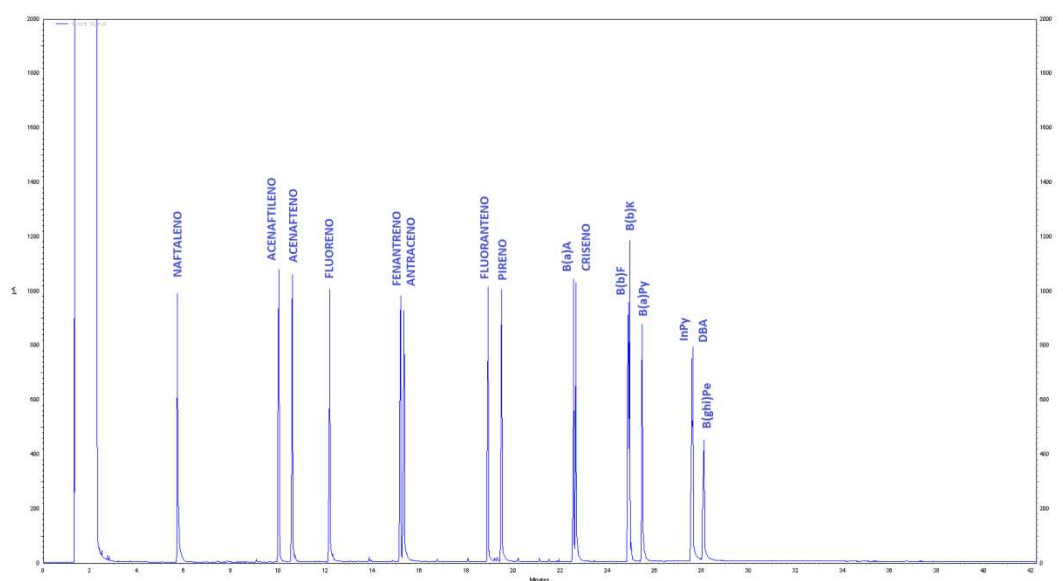


Figura 2: Cromatograma del patrón 3 de hidrocarburos aromáticos (60 ppm).

2.5.5. CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES EN LAS MUESTRAS.

La identificación cuantitativa de los rangos de hidrocarburos en las muestras se realiza a partir del área cromatográfica y los factores de calibración según la Ecuación 2:

$$C_{Rango} = \frac{A}{FC}$$

[Ecuación 2]

La concentración de los rangos de hidrocarburos en las muestras de medio de cultivo acuosas se proporciona con una cifra decimal como mg L^{-1} , de acuerdo a la Ecuación 3:

$$C_{HC}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{C_R \times V_F \times 10^{-3}}{V_{MC}}$$

[Ecuación 3]

Donde V_F es el volumen (expresado en mL) en el que se disuelve la muestra para ser inyectada en el GC/FID, y V_{MC} es el volumen (expresado Litros) del medio de cultivo.

3. RESULTADOS.

3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.

3.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL: MÉTODO DE EXTRACCIÓN.

Se parte de un método optimizado para el análisis de cadenas en muestras de agua. Para optimizar el método, se prepararán diferentes muestras de medio de cultivo enriquecido con diésel. Para hacer los ensayos, se realizará con alícuotas de 40 mL de medio de cultivo a las que se le ha añadido 40 µL de diésel.

Se utiliza un diseño de experimentos mediante el programa informático Statgraphics. Se configura una secuencia de experimentos con el fin de que produzcan la mayor información posible sobre los factores escogidos y sus interacciones con el menor número de experimentos posible.

El primer paso es definir la variable respuesta, en nuestro caso será el contenido de TPH presente en el medio de cultivo, que será el parámetro a maximizar a lo largo de la secuencia de experimentos. La concentración de TPH total se ha establecido que varía entre 0 – 1000 ppm.

Los factores experimentales que variarán a lo largo del transcurso de los experimentos son cuatro. Las variables que se evaluarán son:

- *Porcentaje de acetona en la muestra (5 – 20 %).*
- *Tiempo de secado (5 – 20 minutos).*
- *Elución con un volumen de hexano (1 – 5 mL).*
- *Elución con un volumen de DCM (1 – 5 mL).*

Se debe escoger un diseño experimental con la mayor resolución posible, capaz de estimar los efectos principales y las interacciones entre dos factores, y el mayor número de grados de libertad posibles. Para un diseño que evalúa cuatro factores continuos se ha escogido un diseño factorial con la máxima resolución y 4 puntos centrales aleatorios, de este modo se realizarán un total de 20 ejecuciones.

El modelo escogido considera la interacción de los cuatro factores y las interacciones entre dos factores, de acuerdo a la Ecuación 4.

$$\begin{aligned}
 Y_{TPH} = & \beta_0 + \beta_{acetona}X_{acetona} + \beta_{tiempo}X_{tiempo} + \beta_{hexano}X_{hexano} + \beta_{DCM}X_{DCM} \\
 & + \beta_{acetona-tiempo}X_{acetona}X_{tiempo} + \beta_{acetona-hexano}X_{acetona}X_{hexano} \\
 & + \beta_{acetona-DCM}X_{acetona}X_{DCM} + \beta_{tiempo-hexano}X_{tiempo}X_{hexano} \\
 & + \beta_{tiempo-DCM}X_{tiempo}X_{DCM} + \beta_{hexano-DCM}X_{hexano}X_{DCM}
 \end{aligned}$$

[Ecuación 4]

Una vez definido el experimento se realizan las 20 ejecuciones indicadas y se evalúan los resultados. En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 13: Características y resultados de las ejecuciones del modelo para optimizar el método de extracción.

Ejecución experimento	Acetona (%)	Tiempo (min)	Hexano (mL)	DCM (mL)	TPH (ppm)
1	5	20	5	5	524
2	20	5	5	1	152
3	20	20	1	5	474
4	12,5	12,5	3	3	328
5	20	20	5	5	429
6	12,5	12,5	3	3	377
7	5	20	1	5	580
8	20	5	1	1	359
9	12,5	12,5	3	3	429
10	20	5	1	5	356
11	5	5	1	5	452
12	5	5	1	1	437
13	5	20	5	1	682
14	5	5	5	5	494
15	20	5	5	5	153
16	5	5	5	1	558
17	20	20	1	1	109
18	5	20	1	1	598
19	20	20	5	1	491
20	12,5	12,5	3	3	273

Según los resultados del diseño experimental, los 4 factores tienen diferentes contribuciones al contenido de TPH. El diagrama de Pareto muestra que el contenido de acetona tiene una contribución negativa mientras que los otros tres factores son positivos. La representación gráfica de los efectos principales (Figura 3) nos muestra que al aumentar el contenido de acetona en la muestra, la recuperación el nivel de TPH disminuye drásticamente. Contrariamente, al aumentar el tiempo de secado, el valor de TPH aumenta considerablemente, mientras que el contenido de hexano y DCM afecta en menor medida al contenido de TPH, aunque en ambos casos tienen una contribución positiva.

Gráfica de Efectos Principales para TPH

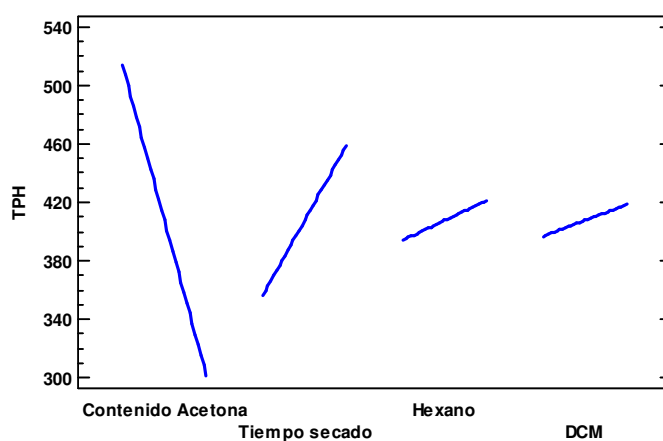


Figura 3: Gráfica de efectos principales del diseño experimental para el análisis del TPH en un medio de cultivo.

Es destacable la interacción entre los dos disolventes orgánicos empleados en la elución. Según se aprecia en la Figura 4, si el volumen de hexano usado en la elución es bajo, para aumentar el contenido de TPH es necesario aumentar el volumen de DCM. Se debe a que con un volumen bajo de hexano no se recupera todo el diésel adsorbido en los cartuchos de SPE. Sin embargo, si el volumen de hexano para realizar la elución es alto, al aumentar el volumen de DCM se produce una disminución del TPH. Esta circunstancia se debe a que se genera un mayor volumen de disolvente orgánico que tiene que ser concentrado posteriormente, por lo tanto aumenta el tiempo de concentración y por consiguiente aumentan las pérdidas por volatilidad.

Gráfica de Interacción para TPH

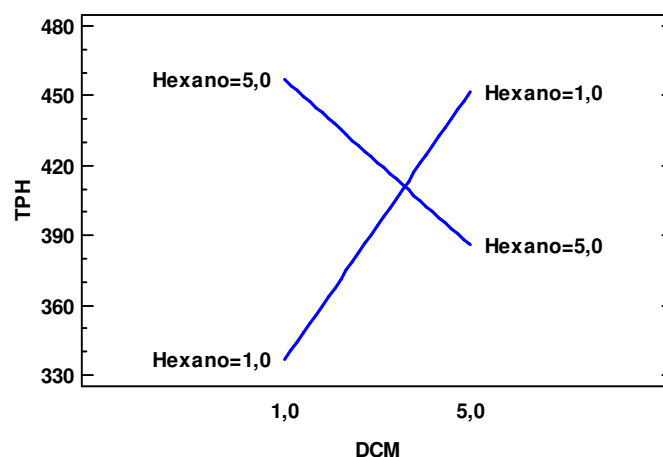


Figura 4: Gráfica de interacción de los factores volumen de hexano y volumen de DCM para la elución.

El modelo ha sido ajustado de acuerdo con las 4 variables estudiadas. El modelo explica el 80 % de la variación de la respuesta estudiada. En la Figura 5 se representa la superficie de respuesta estimada por el modelo.

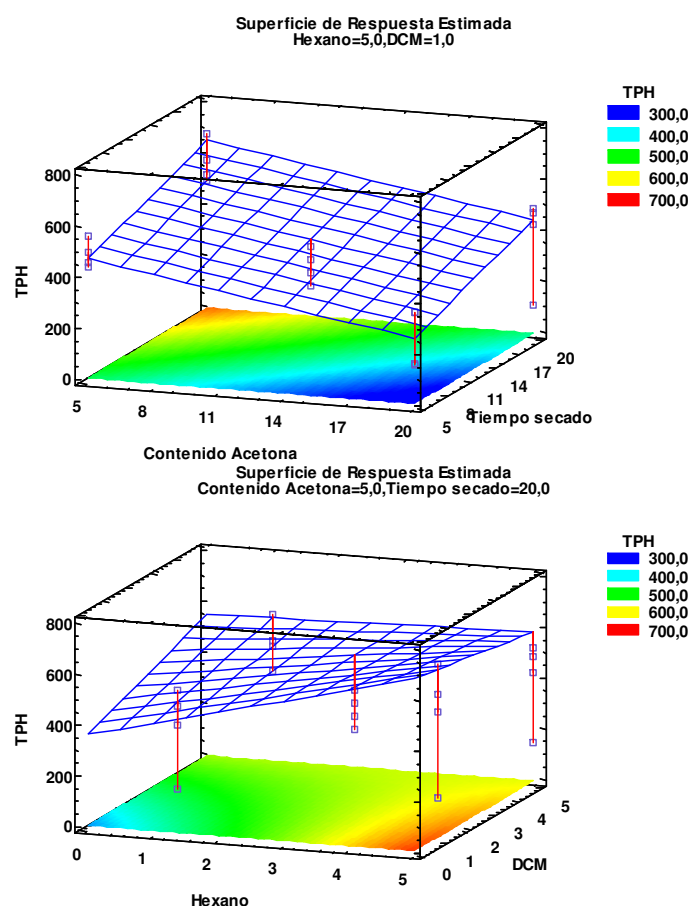


Figura 5: Superficie de respuesta obtenida en el desarrollo experimental para el análisis del TPH.

De acuerdo al modelo, las condiciones óptimas para determinar el contenido de diésel en un medio de cultivo con el método propuesto son las siguientes (Tabla 14).

Tabla 14: Condiciones óptimas para determinar el contenido de diésel en un medio de cultivo.

Variable	Valor mínimo	Valor máximo	Valor óptimo
Contenido acetona	5 %	20 %	5 %
Tiempo secado	5 minutos	20 minutos	20 minutos
Volumen hexano	1 mL	5 mL	5 mL
Volumen DCM	1 mL	5 mL	1 mL

3.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL: MÉTODO DE LAVADO.

Debido a las características de las muestras analizadas, parte del diésel contenido en un medio acuoso tiende a quedarse sobre las paredes de vidrio que lo contiene. Es por ello que los métodos de lavado son necesarios para aumentar la recuperación en los análisis de hidrocarburos en medios acuosos.

Del mismo modo que en el punto anterior se utiliza el diseño de experimentos mediante el programa informático Statgraphics.

Para hacer las pruebas, se realizará con alícuotas de 20 mL de medio de cultivo a las que se le ha añadido 20 μ L de diésel. De acuerdo al método de extracción optimizado en punto 3.1.1.se

añade el 5 % de acetona (1 mL). Las muestras se agitan y se realiza su análisis según el procedimiento anteriormente descrito.

La variable que se maximizará a lo largo de la secuencia de experimentos será el contenido de TPH que queda en el material de vidrio que contenía la muestra una vez que ésta ha pasado por los cartuchos de SPE. La concentración de TPH total se ha establecido que varía entre 0 – 1000 ppm.

Los factores experimentales que variarán a lo largo del transcurso de los experimentos son tres. Las variables que se evaluarán son:

- *Volumen de Acetona en el lavado: 0 – 5 mL.*
- *Volumen de Hexano en el lavado: 0 – 5 mL.*
- *Volumen de DCM en el lavado: 0 – 5 mL.*

Para el diseño experimental que evalúe tres factores continuos se ha escogido un diseño factorial con la máxima resolución y 2 puntos centrales aleatorios, de este modo se realizarán un total de 14 ejecuciones.

El modelo escogido considera la interacción de los tres factores y las interacciones entre dos factores, de acuerdo a la siguiente Ecuación 5.

$$Y_{TPH} = \beta_0 + \beta_{acetona}X_{acetona} + \beta_{hexano}X_{hexano} + \beta_{DCM}X_{DCM} + \beta_{acetona-hexano}X_{acetona}X_{hexano} + \beta_{acetona-DCM}X_{acetona}X_{DCM} + \beta_{hexano-DCM}X_{hexano}X_{DCM}$$

[Ecuación 5]

Una vez definido el experimento se realizan las 14 ejecuciones indicadas y se evalúan los resultados. En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 15: Características y resultados de las ejecuciones del modelo para optimizar el método de lavado.

Ejecución experimento	Acetona (mL)	Hexano (mL)	DCM (mL)	TPH (ppm)
1	0	0	0	0
2	2.5	5	0	191
3	0	0	5	209
4	2.5	0	0	128
5	0	5	5	171
6	5	0	5	160
7	5	0	0	10
8	5	5	5	153
9	5	5	0	203
10	2.5	2.5	2.5	172
11	2.5	0	5	234
12	0	5	0	192
13	2.5	2.5	2.5	153
14	2.5	5	5	211

Según los resultados obtenidos por el diseño experimental las variables volumen de hexano y volumen de DCM afectan de forma positiva al contenido de TPH medido, mientras que la cantidad de acetona tiene un efecto negativo en el contenido de TPH.

Gráfica de Efectos Principales para Concentración TPH

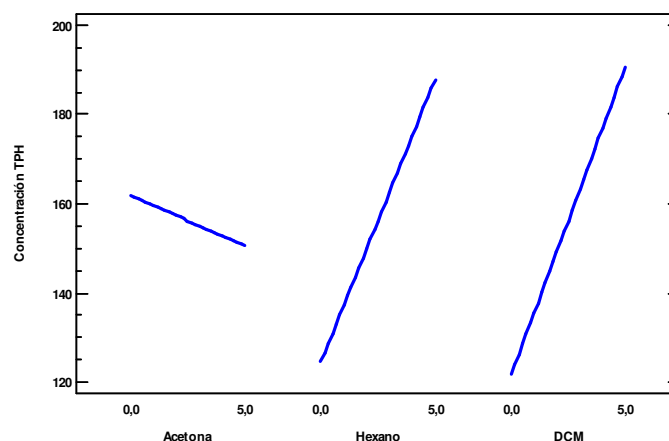


Figura 6: Gráfica de efectos principales del diseño experimental para el método de lavado.

La interacción entre los factores volumen de hexano y volumen de DCM ha sido asignada como el factor con más peso en el modelo. Se aprecia que cuando el volumen de hexano empleado para lavar es mínimo, el aumento del volumen de DCM mejora considerablemente el TPH medido gracias a la etapa de lavado. Sin embargo, cuando el volumen de hexano empleado en el lavado es máximo, el empleo de DCM no mejora los resultados, sino que incluso baja ligeramente debido a posibles pérdidas a lo largo del proceso de concentración, como se explicó anteriormente.

Gráfica de Interacción para Concentración TPH

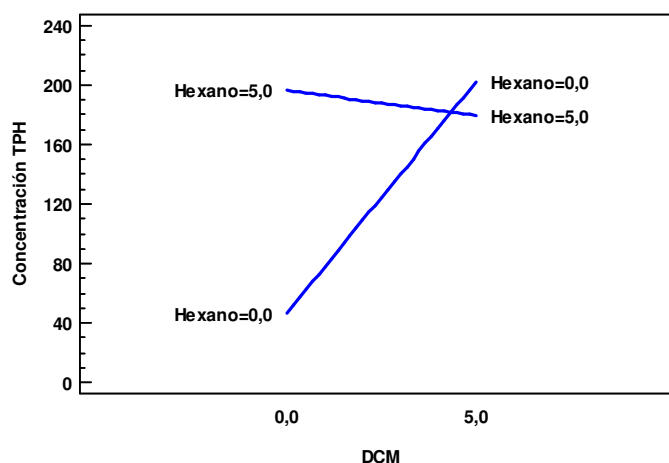


Figura 7: Gráfica de interacción de los factores volumen de hexano y volumen de DCM para el lavado.

El modelo ha sido ajustado de acuerdo con las 3 variables estudiadas y la interacción entre el volumen de hexano y volumen de DCM. El modelo propuesto explica el 76 % de la variación de la respuesta estudiada. En los siguientes gráficos se representa la superficie de respuesta estimada por el modelo para los tres factores estudiados.

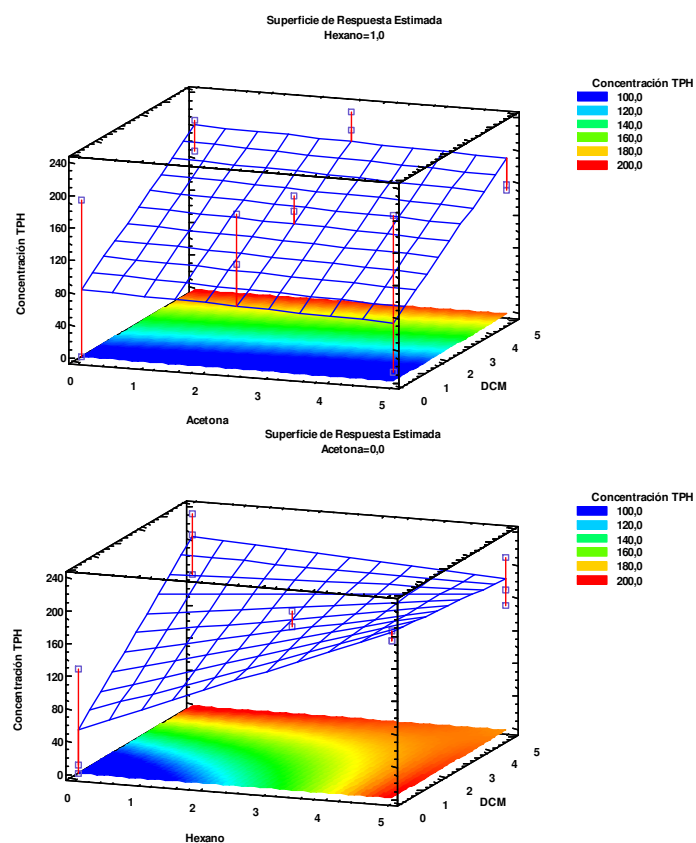


Figura 8: Superficie de respuesta obtenida en el desarrollo experimental para el método de lavado.

De acuerdo al modelo, las condiciones óptimas para el lavado empleado para determinar el contenido de diésel en un medio de cultivo se recogen en la Tabla 16.

Tabla 16: Condiciones óptimas para el lavado del material de vidrio.

Variable	Valor mínimo	Valor máximo	Valor óptimo
Volumen acetona	0 mL	5 mL	0 mL
Volumen hexano	0 mL	5 mL	5 mL
Volumen DCM	0 mL	5 mL	1 mL

3.2. MÉTODO DE ANÁLISIS.

De acuerdo con los dos diseños experimentales realizados, el método propuesto para analizar el contenido de diésel en un medio de cultivo con microorganismos quedaría según el diagrama de la Figura 9.

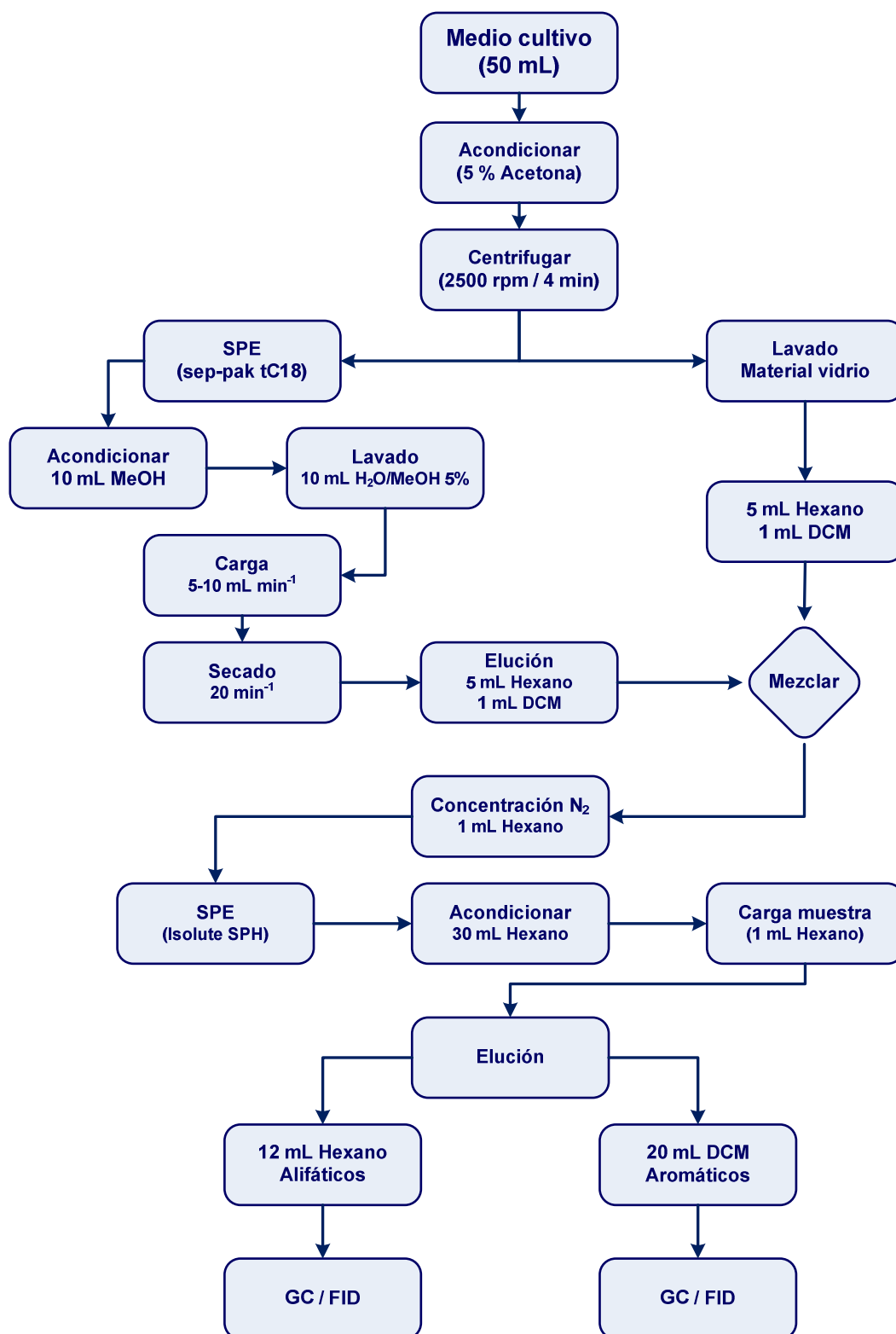


Figura 9: Esquema del método de análisis del diésel en un medio de cultivo de microorganismos.

Se procede a tomar 50 mL del medio de cultivo con una pipeta, que se deposita en un tubo de centrifuga. A continuación, la muestra acuosa debe acondicionarse mediante la adición de un disolvente orgánico con lo que se modifica la polaridad de la matriz y se favorece la disolución de los

hidrocarburos presentes. Para ello se debe añadir 2,5 mL de acetona. Para eliminar los microorganismos presentes en la muestra, se debe centrifugar durante 4 minutos a 2500 rpm.

Todo el material de vidrio que esté en contacto con la muestra debe lavarse para minimizar las pérdidas de hidrocarburos durante el análisis, ya que estos compuestos tienden a quedarse adsorbidos sobre la superficie de los materiales que los contienen. El proceso de lavado consiste en añadir 5 mL de hexano y 1 mL de DCM, para a continuación añadir sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua. La mezcla de disolventes orgánicos se recoge en tubos de ensayo hasta su utilización

Los cartuchos de SPE deben activarse antes de su empleo. La etapa de activación consiste en hacer pasar un disolvente orgánico fuerte, como mínimo 2-4 veces el volumen del lecho. Para los cartuchos empleados [*Waters sep pak tC_{18} (6 mL / 1g)*] 10 mL de MeOH son suficientes para activar completamente el adsorbente. Una vez activado, se debe proceder a equilibrar del cartucho y para ello se hacen pasar 10 mL de la mezcla agua/MeOH al 5 %. Para activar y acondicionar los cartuchos se aplica vacío (presión 150 – 200 mmHg). A continuación, y sin dejar secar el adsorbente, comienza la etapa de carga de la muestra. En la parte superior del cartucho se acopla un adaptador y una tubería de teflón que se introduce en la muestra. Se conecta la bomba de vacío y comienza a pasar la muestra a un caudal constante de 5 mL min⁻¹. La cuarta etapa consiste en secar el adsorbente. Esta etapa es fundamental para mejorar el rendimiento de la extracción. Para ello se hace pasar aire durante 20 minutos mediante la aplicación de vacío (presión 400 mmHg). La última etapa consiste en eluir la muestra retenida. Para ello se hace pasar 5 mL de hexano y 1 mL de diclorometano. Se aplica una ligera presión para obtener un caudal de 1 mL min⁻¹. En la Figura 10 se presenta el esquema del procedimiento de extracción en fase sólida.

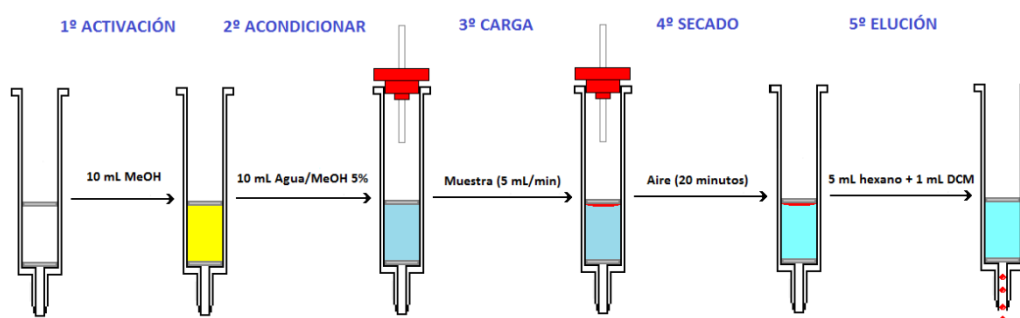


Figura 10: Esquema de la SPE de los cartuchos Waters Sep-pak tC_{18} .

El eluato y el disolvente orgánico del lavado se juntan para seguir con el procedimiento de análisis. Para evitar las trazas de agua es necesario añadir sulfato de sodio anhidro a la mezcla. Finalmente, se concentra con nitrógeno hasta 1 mL de hexano y se procede a su fraccionamiento.

El fraccionamiento se realiza mediante el empleo de los cartuchos de SPE de fase normal Isolute (25 mL / 5 g). Estos cartuchos deben activarse antes de su empleo, y para ello se hacen pasar 30 mL de hexano. A continuación, y sin dejar secar el adsorbente, comienza la etapa de carga de la muestra. Ésta consiste en depositar la muestra, disuelta en 1 mL de hexano, en la parte superior del

lecho. Por gravedad la muestra se introduce en el cartucho. La etapa de elución consiste en añadir 12 mL de hexano. Este disolvente pasa a través del cartucho y se recogen en un vial marcado como fracción alifática. El volumen de hexano es crítico, ya que un exceso de hexano puede producir la elución de los compuestos aromáticos. Una vez recogida la primera fracción y sin que se haya secado el lecho del cartucho, se añaden 20 mL de diclorometano, que se recogen en un vial marcado como fracción aromática. El fraccionamiento se realiza sin necesidad de aplicar presión. Por gravedad los disolventes pasan a través del cartucho, a una velocidad de 2-3 mL min⁻¹. En la Figura 11 se presenta el esquema del procedimiento de extracción en fase sólida.

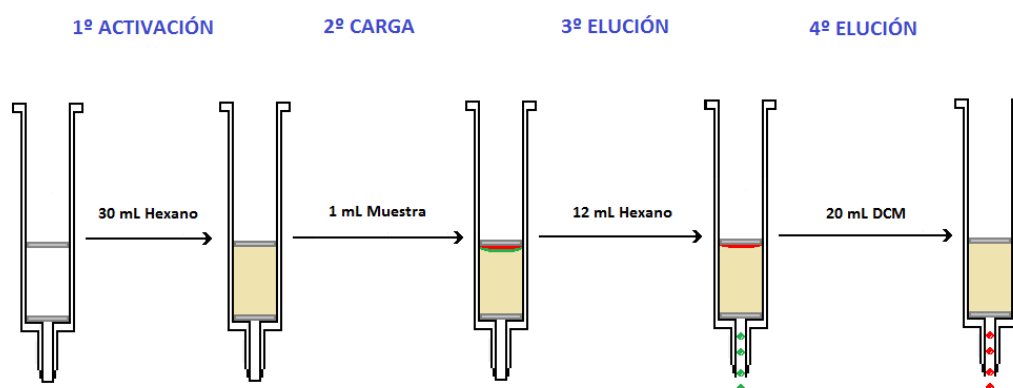


Figura 11: Esquema del fraccionamiento del diésel mediante cartucho Isolute EPH.

3.3. CAPACIDAD DE CARTUCHOS SEP-PAK PARA EL DIÉSEL.

Se determina la capacidad de los cartuchos Sep-pak para retener el diésel presente en un medio de cultivo de microorganismos. La capacidad de un cartucho se define como la cantidad de analito, en este caso diésel, que puede retener el adsorbente sin que se llegue a la saturación de éste. Para estudiar la capacidad del cartucho se hacen pasar cantidades mayores de diésel manteniendo constante el volumen del medio de cultivo.

Las muestras que se analizarán tienen una concentración teórica de diésel en el medio de cultivo en torno a 1000 ppm. Para realizar el estudio de capacidad se analizarán alícuotas de medio de cultivo de 50 mL según el procedimiento optimizado a las que se les añadirán diferentes cantidades de diésel. Las alícuotas y la concentración de cada una de los ensayos que se van a realizar están definidas en la Tabla 17.

Tabla 17: Alícuotas analizadas para determinar la capacidad del cartucho Sep-Pak.

	Medio cultivo (mL)	Acetona (mL)	Diésel (μL)	Concentración (ppm)
1	50	2.5	5	100
2	50	2.5	10	200
3	50	2.5	25	500
4	50	2.5	50	1000
5	50	2.5	100	2000
6	50	2.5	250	5000
7	50	2.5	500	10000

Para determinar la capacidad de los cartuchos, únicamente se analizará la muestra que se haya eluido de los cartuchos, sin incluir los lavados. Sin embargo como se ha podido ver anteriormente las recuperaciones oscilarán ya que una parte del diésel queda sobre las paredes de vidrio y no entra por el cartucho de SPE. Se estima que un 20 % del diésel se recoge en los lavados.

Para calcular la capacidad se representa la recuperación obtenida en cada caso respecto al compararlo con un patrón de diésel que no ha pasado por la columna. En la Figura 12 se presentan los resultados.

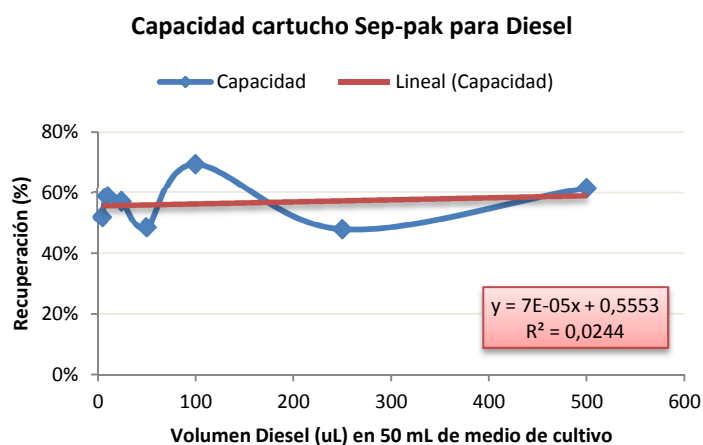


Figura 12: Capacidad del cartucho Sep.pak para retener diésel.

Se observa que la recuperación oscila entre el 50 – 70 %, debido a que no se han incluido los resultados de los lavados. Sin embargo si se aprecia que la recuperación no disminuye con la cantidad de diésel que pasa por el adsorbente, lo que indica que no se ha llegado a la capacidad del cartucho. Se representa la regresión entre las dos variable y no se aprecia una disminución de la recuperación con el aumento de la cantidad de diésel. Se puede concluir que capacidad del cartucho Sep-pak para determinar diésel en un medio de cultivo es superior a 10000 ppm.

3.4. FRACCIONAMIENTO.

Uno de los objetivos del trabajo consiste en determinar qué fracciones de hidrocarburos, presentes en el diésel, son degradadas y en qué proporción al utilizar microorganismos. Para ello en primer lugar se debe determinar la composición del diésel empleado. Por normal general el diésel está compuesto por $\frac{3}{4}$ parte por hidrocarburos saturados y $\frac{1}{4}$ por hidrocarburos aromáticos.

Para determinar la composición del diésel se procede a realizar el fraccionamiento de 4 alícuotas de diésel, con una concentración de 1000 mg/L en hexano, según el procedimiento descrito en punto 3.2.

Una vez realizado el fraccionamiento del diésel, se procede a analizar las diferentes cadenas que lo componen. En las Figuras 13 y 14 se representa la composición de las fracciones de hidrocarburos en función del número de átomos de carbono.

Cadenas de compuestos alifáticos en Diesel

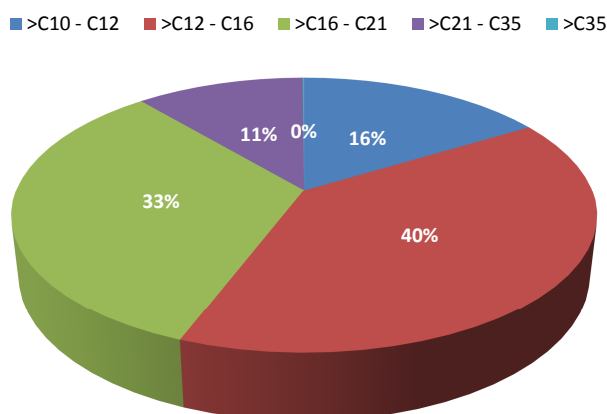


Figura 13: Distribución de cadenas de hidrocarburos alifáticos presentes en el diésel.

Cadenas de compuestos aromáticos en Diesel

■ >C10 - C12 ■ >C12 - C16 ■ >C16 - C21 ■ >C21 - C35 ■ >C35

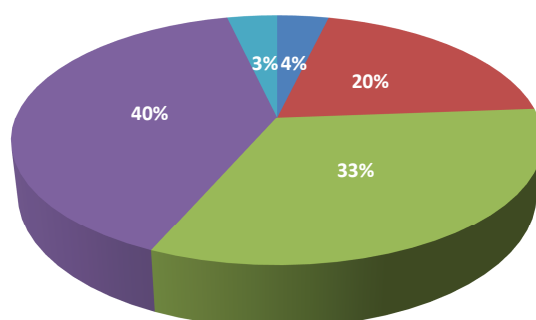


Figura 14: Distribución de cadenas de hidrocarburos aromáticos presentes en el diésel.

La fracción alifática está compuesta principalmente por hidrocarburos volátiles, más de 50% está formado por compuestos con menos de 16 átomos de carbono. Los compuestos de más de 21 átomos de carbono solo representan el 10 % del diésel. En cuanto a la fracción aromática, que representa únicamente el 20 % del diésel, solamente el 25 % está compuesto por hidrocarburos con un número equivalente de carbono inferior 16, mientras que el 40 % está formado por hidrocarburos más pesados, con número equivalente de carbono superior a 21.

3.5. VALIDACIÓN

3.5.1. LINEALIDAD

La linealidad ha sido evaluada mediante el uso de los factores de calibración, los cuales determinan la relación entre la señal del detector y la concentración de analito inyectada. Para determinar la linealidad se ha inyectado por triplicado, seis disoluciones de hidrocarburos alifáticos y seis disoluciones de hidrocarburos aromáticos a diferentes concentraciones. Los factores de calibración son calculados como la relación entre el área del pico cromatográfico y la concentración inyectada.

En la Tabla 18 se presentan los factores de calibración obtenidos, así como la desviación estándar relativa. La concentración más baja y la concentración más alta definen el intervalo de trabajo donde la señal del detector es lineal.

Tabla 18: Linealidad para el análisis de hidrocarburos en un medio de cultivo.

Rango	Inicio linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fin linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FC	RDS (%)
Alifáticos				
>C ₁₀ – C ₁₂	25	150	507.241	3
>C ₁₂ – C ₁₆	25	200	507.809	6
>C ₁₆ – C ₂₁	25	200	509.975	5
>C ₂₁ – C ₃₅	25	200	487.752	5
>C ₃₅	25	100	333.553	15
Aromáticos				
>EC ₁₀ – EC ₁₂	20	100	585.134	4
>EC ₁₂ – EC ₁₆	20	100	591.750	5
>EC ₁₆ – EC ₂₁	20	100	578.406	4
>EC ₂₁ – EC ₃₅	20	100	569.131	4
>EC ₃₅	20	100	420.488	3
TPH	25	200	458.203	8

3.5.2. RECUPERACIÓN.

Se realiza un estudio de recuperación del método de análisis optimizado para cuantificar el contenido de diésel en un medio acuoso de cultivo. Este estudio consiste en analizar 8 alícuotas de 20 mL de medio acuoso enriquecidas con 20 μL de diésel según el procedimiento en diferentes días.

Los resultados obtenidos para las ocho alícuotas son comparados con muestras de diésel de la misma concentración para calcular la recuperación del método de análisis. Los resultados obtenidos están en la Tabla 19.

Tabla 19: Recuperación obtenida en el análisis de 8 alícuotas de muestra marcadas con diésel.

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)	Media
> C ₁₀ – C ₁₂	43	58	61	63	57	72	64	70	61
> C ₁₂ – C ₁₆	57	69	68	71	67	79	69	79	70
> C ₁₆ – C ₂₁	62	72	71	75	69	81	70	81	73
> C ₂₁ – C ₃₅	64	74	72	76	70	82	71	83	74
> C ₃₅	123	121	120	116	121	122	107	118	119
TOTAL DIESEL	57	69	68	71	66	79	68	79	70

Se observa que la recuperación es ligeramente más baja para los compuestos más volátiles, debido a las pérdidas que se producen a lo largo del proceso de tratamiento de muestra, principalmente durante la etapa de concentración bajo una ligera corriente de nitrógeno.

El estudio estadístico del conjunto de datos ha demostrado que provienen de una distribución normal y que no existen valores aberrantes. La Figura 15 representa el diagrama de caja y bigotes de la recuperación de TPH, mientras que la Figura 16 representa la gráfica de posibles valores aberrantes.

Gráfico de Caja y Bigotes

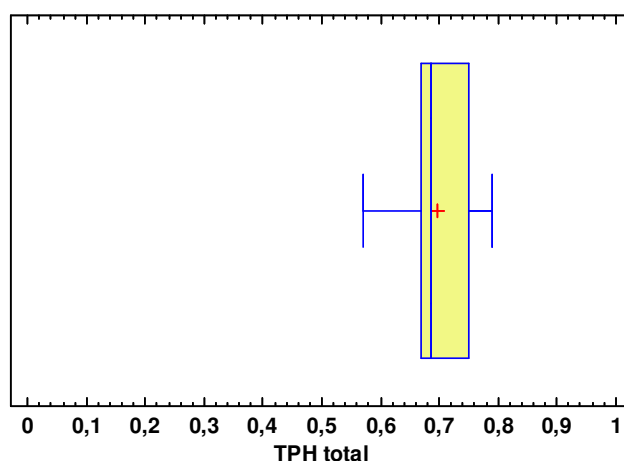


Figura 15: Diagrama de caja y bigotes de la recuperación de TPH en muestras de medio de cultivo.

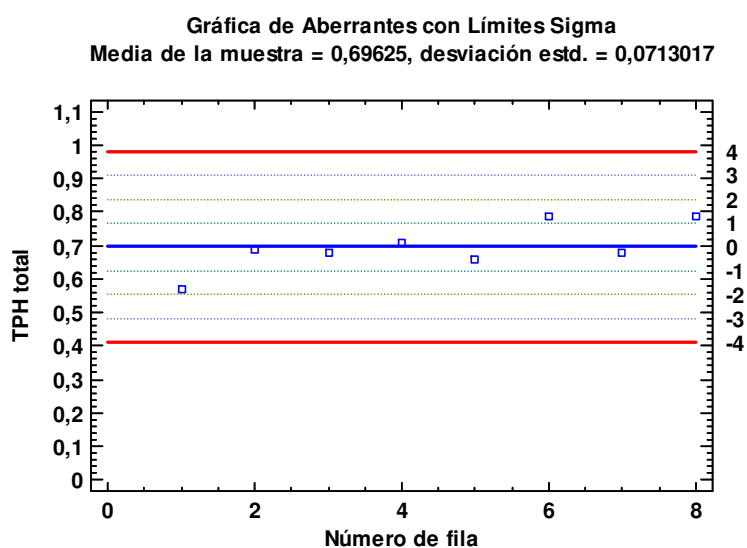


Figura 16: Grafica de valores aberrantes para la recuperación de TPH.

De acuerdo al estudio estadístico puede establecerse con un 95 % de confianza que la recuperación obtenida al aplicar el método propuesto para determinar el contenido de diésel en un medio de cultivo de microorganismos se encuentra comprendida entre el 64 – 75 % con una desviación estándar de entre 5 – 14 %.

3.5.3. PRECISIÓN.

Para validar un procedimiento analítico existen diferentes medidas de la precisión, siendo las dos más importantes la repetitividad y la precisión intermedia.

Para realizar el estudio se han preparado alícuotas de medio de cultivo marcadas con 1000 mg L⁻¹ de diésel. La repetitividad se calcula como la desviación estándar relativa obtenida al inyectar consecutivamente 4 alícuotas de medio de cultivo. Por otro lado, la precisión intermedia se establece como la desviación estándar relativa obtenida al analizar a lo largo de una semana 11

alícuotas de medio de cultivo enriquecidas con 1000 mg L^{-1} de diésel. Los resultados de repetitividad y precisión intermedia están resumidos en la Tabla 20.

Tabla 20: Repetitividad y precisión intermedia del análisis de diésel en un medio de cultivo.

Rango Hidrocarburos	Repetitividad (n=4) RDS (%)	Precisión intermedia (n=11) RDS (%)
>C ₁₀ – C ₁₂	1	8
>C ₁₂ – C ₁₆	2	6
>C ₁₆ – C ₂₁	3	5
>C ₂₁ – C ₃₅	3	5
>C ₃₅	3	6
TPH	2	6

4. CONCLUSIONES.

Se ha procedido a la optimización de un método analítico para determinar el contenido de diésel y la composición de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en un medio de cultivo con microorganismos.

El método desarrollado será aplicado en el seguimiento de varias pruebas de laboratorio que tienen como objetivo determinar el grado de degradación de diésel que tienen diferentes bacterias. Así mismo, el método optimizado permitirá determinar que fracciones de hidrocarburos alifáticos o aromáticas son degradadas por cada microorganismo.

El método de análisis del diésel en el medio de cultivo se basa en una extracción en fase sólida empleando adsorbentes de fase inversa, un fraccionamiento con adsorbentes de fase normal y una última etapa de análisis mediante GC-FID.

Para realizar la optimización de la metodología se ha partido de un método validado para analizar hidrocarburos en agua. Se ha aplicado un diseño experimental con el objetivo de maximizar la recuperación de diésel a lo largo de la etapa de extracción y el proceso de lavado del material.

Se ha evaluado la capacidad de los cartuchos empleados para la extracción de diésel presente en un medio de cultivo. La capacidad ha demostrado ser superior a $10\,000\text{ mg L}^{-1}$, por lo que el método propuesto puede ser aplicado satisfactoriamente en los ensayos propuestos.

La viabilidad del procedimiento ha sido demostrada mediante un estudio de validación. Se han establecido varios parámetros analíticos como la linealidad, la recuperación, repetitividad y la precisión intermedia.

Se ha establecido con un 95 % de confianza que la recuperación obtenida al aplicar el método propuesto para determinar el contenido de diésel en un medio de cultivo con microorganismos se encuentra comprendida entre el 64 – 75 % con una desviación estándar de entre 5 – 14 %

La repetitividad calculada es inferior al 3 %, mientras que la precisión intermedia se ha establecido con valores de RDS inferiores al 8 %.

5. REFERENCIAS

1. Siegl, W.O., et al., *Organic emissions profile for a light-duty diesel vehicle*. *Atmospheric Environment*, 1999. **33**(5): p. 797-805.
2. Zielinska, B., *Atmospheric transformation of diesel emissions*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2005. **57**, **Supplement 1**: p. 31-42.
3. Voyevoda, M., W. Geyer, and S. Mothes, *An improved gas chromatographic method for the determination of C6-C12 petroleum hydrocarbons in soil water*. *Clean-Soil Air Water*, 2008. **36**(2): p. 164-170.
4. Chesler, S.N., A.P. Emery, and D.L. Duewer, *Recovery of diesel fuel from soil by supercritical fluid extraction-gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1997. **790**(1-2): p. 125-130.
5. Khalladi, R., et al., *Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **164**(2-3): p. 1179-1184.
6. Coulon, F., et al., *Multimedia fate of petroleum hydrocarbons in the soil: Oil matrix of constructed biopiles*. *Chemosphere*, 2010. **81**(11): p. 1454-1462.
7. Weisman, W., *Petroleum Hydrocarbon analysis of Soil and Water in the Environment*. Vol. 1. 1997, Amherst, MA: Amherst Scientific Publishers.
8. Gustafson, J.B., J.G. Tell, and D. Orem, *Selection of representative TPH fractions based on fate and transport considerations*. Vol. 3. ed. 1997, Amherst, MA: Amherst Scientific Publishing.
9. Wu, M., et al., *Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016. **107**: p. 158-164.
10. Suja, F., et al., *Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014. **90**: p. 115-122.
11. Thangarajan, R., et al., *Comparison between different bio-treatments of a hydrocarbon contaminated soil from a landfill site*. *African Journal of Biotechnology*, 2011. **10**(67): p. 15151-15162.
12. Das, K. and A.K. Mukherjee, *Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India*. *Bioresource Technology*, 2007. **98**(7): p. 1339-1345.

13. Viñas, M., et al., *Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(11): p. 7008-7018.
14. Sarkar, D., et al., *Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation*. *Environmental Pollution*, 2005. **136**(1): p. 187-195.
15. Bento, F.M., et al., *Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation*. *Bioresource Technology*, 2005. **96**(9): p. 1049-1055.
16. Pindado Jiménez, O., et al., *Exploring petroleum hydrocarbons in groundwater by double solid phase extraction coupled to gas chromatography-flame ionization detector*. *Talanta*, 2015. **131**(0): p. 315-324.
17. Pindado Jiménez, O., R.M. Pérez Pastor, and O. Escolano Segovia, *Petroleum hydrocarbons fractions in soils: develop of analytical method and uncertainty associated*. *Analytical Methods.*, 2014.
18. Pindado Jiménez, O., R.M. Pérez Pastro, and S. García Alonso, *Análisis del TPH y las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en matrices de interés medioambiental*. *Informes Técnicos CIEMAT*, 2014. **1312**.

