

## **La problemática analítica en el monitoreo de la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.**

Sergio Turquía

Lic. En Ciencias Químicas (UBA), Especialista en Seguridad e Higiene en el Trabajo (UBA), Especialista en Ciencias Químicas y Ambiente (UBA). Director Técnico Corporativo de Corplab S.A. Docente de la Universidad Nacional de Quilmas. Ex Jefe de Sistemas de la Calidad de Henkel Argentina S.A.

Hernán Cortés 104 (B1872ASB). 4265-2000. Avellaneda, Buenos Aires.  
[sturquia@corplab.net](mailto:sturquia@corplab.net)

Oscar Costanza

Bioquímico (UNLP). Auditor Ambiental ISO 14001. Departamento Medio Ambiente INCAM SA

Calle 12 N° 219 - La Plata. Tel (0221)424 - 7813  
[oscarcostanza@hotmail.com](mailto:oscarcostanza@hotmail.com)

Graciela Vecchioli

Lic. en Ciencias Bioquímicas y Dra en Cs. Bioquímicas (UNLP). Experta en Biorremediación. Departamento de Medio Ambiente INCAM SA.

Calle 12 N° 219 - La Plata. Tel (0221)424 - 7813  
[gravec@incam.com.ar](mailto:gravec@incam.com.ar)

Palabras Claves: Determinaciones analíticas. Hidrocarburos. Suelos. Biorremediación.

## RESÚMEN

Se presenta la problemática analítica para el seguimiento biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Los problemas se basan en que la metodología tradicionalmente utilizada por infrarrojo no se correlaciona con la evolución de los parámetros biológicos. Se observan altos valores de hidrocarburos cuando los indicadores biológicos indicarían la finalización de la etapa activa de biodegradación. Se propone como causa probable un clean-up insuficiente de los extractos a medida que avanza la biodegradación del contaminante como consecuencia de la generación de productos intermedios de degradación, con cierta polaridad, que no son eficientemente retenidos. Esto causaría un elevado nivel de señal en el infrarrojo que se interpreta como hidrocarburos cuando en realidad no lo son.

De modo similar al medir los hidrocarburos por cromatografía gaseosa el modo de integrar los picos da diferencias sustanciales en el contenido de hidrocarburos.

Se realizó un ensayo analizando una muestra biodegradada por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas y se identificaron algunos picos correspondientes a biomarcadores, mostrando así que no son separados en la etapa de clean-up y no corresponden a hidrocarburos.

## INTRODUCCIÓN.

La determinación del contenido de hidrocarburos en suelos es bien conocida. Entre las técnicas mas usadas podemos citar la gravimétrica (1), por espectrofotometría de infrarrojo (2), por cromatografía gaseosa (3), por espectrofotometría ultravioleta (4), por turbidimetría (5) y últimamente por inmunoensayos (5).

Las técnicas antes mencionadas requieren una fase extractiva previa para obtener el hidrocarburo libre de suelo. Entre las técnicas más comunes están: Extracción sólido-líquido con extractor tipo Soxhlet (6); por ultrasonido (7); con fluidos supercríticos (8); con solvente a alta presión (9) y por extracción asistida con microondas (10).

Dado que la contaminación con hidrocarburos involucra a una mezcla compleja de compuestos y no a uno en particular, la elección de la metodología de análisis definirá la calidad de los resultados obtenidos (11).

De todas las técnicas mencionadas la más comúnmente utilizada para evaluar procesos de biorremediación es la de espectrofotometría por infrarrojo, previa extracción por sonicación debido al menor costo de la determinación. Sin embargo, su utilización no siempre proporciona datos coherentes (12) ni correlación con los resultados de las determinaciones de parámetros biológicos (13).

Las autoridades de control hacen uso de los datos medidos por espectrofotometría de infrarrojo que los laboratorios proveen y ésto presenta problemas al momento de tomar decisiones sobre la liberación de un lote remediado.

Se presenta una serie de datos que muestran que el uso de otras técnicas en conjunto con la determinación de los hidrocarburos por cromatografía gaseosa dan como resultado datos coherentes entre si y que, de ser utilizado como herramientas de control por parte de los profesionales abocados a los biotratamientos, así como los organismos de control proporcionaría una herramienta útil para la toma de decisión sobre liberación de lotes biotratados.

## OBJETIVO

Comparar los resultados de las determinaciones de hidrocarburos totales por espectrofotometría infrarrojo con los obtenidos por cromatografía gaseosa y su relación con indicadores biológicos para el seguimiento de procesos de biorremediación.

Proponer métodos para los especialistas en biorremediación y los organismos de control para el seguimiento de los procesos y liberación de lotes tratados.

## PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

El estado del arte en la Argentina respecto de las mediciones de hidrocarburos en suelos no permite la aplicación de la técnica promulgada por la USEPA bajo el número 8440 de la serie de normas comprendidas en el compendio SW-846. Esta técnica hace uso de la extracción de los hidrocarburos por medio de un fluido, el anhídrido carbónico en este caso, en estado supercrítico (método 3560). Para ello se requiere instrumentación de alto costo, la cual no está disponible en los laboratorios privados que se dedican al análisis de estas muestras y dificultosamente se halle en universidades e institutos públicos de investigación científica en los países en desarrollo.

La misma técnica concluye con la determinación analítica de los hidrocarburos por medio de la espectrofotometría en el rango del infrarrojo. Aquí si hay disponibilidad de equipos de la mas variada calidad para permitir la medición.

Los laboratorios se abocan a resolver la problemática utilizando distintas alternativas para superar el déficit de instrumentación para realizar la extracción. Básicamente lo resuelven por dos vías: extracción por soxhlet o por ultrasonido.

La extracción por soxhlet es muy antigua pero muy eficiente y esta ampliamente difundida. La USEPA promulgo el método bajo el compendio antes mencionado, asignándole el número 3540C.

La extracción por ultrasonido es más nueva y no está tan difundida. La USEPA promulgó el método en el compendio mencionado bajo el número 3550B; en éste método se especifica el uso de un instrumento especialmente diseñado para la extracción donde las ondas ultrasónicas se transmiten a un dispositivo en forma de lápiz con una serie de puntas de titanio especiales que tienen un tamaño acorde a la concentración de lo que se quiere extraer. La potencia de las ondas de ultrasonido debe ser superior a 300 W. Lamentablemente estos dispositivos tampoco están ampliamente difundidos, con lo cual muchos laboratorios resuelven la extracción por ultrasonido utilizando equipos diseñados para lavado de piezas pequeñas u otros fines.

El método 8440 establece, luego de la extracción con fluido supercrítico y de una adición de solvente, una limpieza del extracto (clean-up). Se especifica sílica-gel como fase activa en dos modos posibles: en columna o en batch. Previamente el método impone un paso de "calibración" del clean-up realizando pruebas de retención del adsorbente a soluciones mezcla de aceite de maíz con aceite mineral. La eficiencia del sistema se mide a partir de la absorbancia del extracto limpiado a dos números de onda: la de absorción de la unión C-H (2800 - 3000cm<sup>-1</sup>) y la de absorción del grupo ester ( 1600-1800 cm<sup>-1</sup>). En caso de presentar absorbancia, se prueba aumentando la relación sílica-gel / aceite.

El sistema de clean-up indicado presenta la limitación de que puede ser efectivo en la prueba, pero en la realidad de matrices complejas como son los suelos en proceso de biorremediación, puede no ser efectivo (ver mas adelante).

Con las razones expuestas anteriormente llegamos a tener sistemas de análisis que son el resultado de adaptaciones o aplicaciones parciales de cada una de las técnicas mencionadas.

Lo que gran parte de los laboratorios hacen para resolver la problemática es extraer los suelos con soxhlet o con ultrasonido (adaptando equipos diseñados para otros fines), realizando un clean-up con sílica (las más de las veces sin la "calibración" previa) en batch, y una lectura en

espectrofotómetro de infrarrojo en la banda de 2800 a 3000cm<sup>-1</sup>. La determinación de una concentración de “Hidrocarburos Totales” se la realiza por comparación con la señal que producen mezclas de concentración conocida de isooctano, hexadecano y clorobenceno; situación que dista de la realidad de los sitios contaminados; por ello cuando es posible se propone calibrar con los hidrocarburos que originaron el derrame bajo estudio.

Erróneamente en el mercado local se interpreta este resultado como medido “según EPA 418.1” . El método 418.1 es uno diseñado para aguas y aguas residuales y hace uso de la extracción de los hidrocarburos con Freón 113 y medición por espectrofotometría de infrarrojo. Este método ha dejado de utilizarse por causa del Freón, dando lugar al método EPA 1664 donde la materia oleosa se extrae con n-hexano, reportándose el resultado como HEM (Hexane Extractable Material) y no como hidrocarburos.

El compendio de métodos para aguas y aguas residuales publicado por organizaciones dedicadas a aspectos sanitarios y a calidad del agua bajo el nombre de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater en su edición número 20 propone el método codificado bajo el número 5520F para la determinación de hidrocarburos por infrarrojo. Este método solo trata de la medición de un extracto que puede obtenerse de diversos modos. En particular para barros (está diseñado para barros de plantas de tratamiento), propone el método 5520E por soxhlet. El clean-up que se cita en el método hace uso de 3 gramos de sílica-gel por cada 100mg de materia oleosa a tratar por clean-up en batch; una agitación en agitador magnético durante 5 minutos; una filtración y luego la medición. En este método no hay una “ calibración” previa del clean-up; pero hace mención explícita a que el clean-up ha sido probado en mezclas de productos animales y vegetales, pero que no puede ser aplicado a “productos industriales” .

Adicionalmente a los métodos publicados en relación a la medición por infrarrojo, están los métodos por cromatografía gaseosa. La USEPA promulgo el método dentro del compendio SW 846 bajo la denominación 8015B, el cual está indicado como “Orgánicos no halogenados usando CG/FID”. Aquí además de una serie de compuestos específicos, se menciona la posibilidad de usar el método para determinar hidrocarburos en dos rangos: “GRO”,(gasoline range organics) y “DRO”, (diesel range organics). Este método y la forma de evaluar los resultados es la más utilizada entre los profesionales que requieren determinaciones cromatográficas para la caracterización de sitios contaminados, seguimientos de remediación, etc. Se utiliza la suma de estas dos fracciones para tener un resultado de “Hidrocarburos Totales”. Este método no incluye una etapa de clean-up con lo cual hay que remitirse a lo mencionado arriba. La situación problemática que se plantea aquí es la relacionada con el modo de cuantificar. Es característico en los cromatogramas de combustibles ver una elevación de la línea de base ligada a compuestos no resueltos; el método menciona que al integrar los picos se “fuerce” una línea de base horizontal y que se realice una sumatoria de áreas que incluya toda la fracción de compuestos no resueltos. Como sistema que tienda a la homogeneización de la información puede ser correcto; pero muestra diferencias con el modo de integración pico a pico.

En resumen, el problema es el siguiente: los métodos publicados, así como los que por distintas razones se utilizan con modificaciones en base a la disponibilidad de instrumentación, no dan información que se correlacione con evidencias de otro tipo para suelos contaminados con hidrocarburos en procesos de biorremediación.

## **PROPUESTA DE SOLUCIÓN**

En base al problema planteado se proponen alternativas a la medición de los hidrocarburos y el uso en conjunto con técnicas de ensayos biológicos.

El estudio más profundo del sistema de clean-up debería aportar nuevas soluciones al problema planteado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Suelos Contaminados. Los ensayos se realizaron sobre muestras de tierra de la provincia de Buenos Aires contaminadas con hidrocarburos de distintos orígenes, sometidas a procesos de biorremediación.

Método de Extracción. Se mezcló 10,0g de muestra con sulfato de sodio anhidro pro análisis y se colocó la mezcla en cartuchos soxhlet de celulosa previamente lavados. Las muestras fueron extraídas con tetracloruro de carbono grado infrarrojo por Soxhlet durante 20 horas.

Clean-up. A una alícuota de los extractos se le realizó un tratamiento en batch con sílica-gel mesh 60-200 marca Merck con agitación en agitador magnético durante 5 minutos. Se utilizó una masa de sílica-gel de 3g por 100mg de materia orgánica extraída (obtenida por ensayo gravimétrico rápido).

Un rápido ensayo con mezcla 1:1 de aceite de maíz comercial y aceite lubricante comercial 15W40 mostró que el clean-up es efectivo hasta una concentración de 15000 mg/L de ésta mezcla al no obtenerse absorbancia apreciable a 2950cm<sup>-1</sup> en celda de 1 cm de paso óptico. Se utilizó un fotómetro de infrarrojos Buck Scientific HC-404.

Métodos de Determinación del Contenido de Hidrocarburos.

Infrarrojo. El extracto previamente limpiado con sílica-gel se midió por espectrofotometría infrarroja a 2950 cm<sup>-1</sup>. Se estableció la relación señal / concentración realizándose una curva de calibración con mezclas de distinta concentración de n-hexadecano; isooctano y clorobenceno de acuerdo al método EPA 418.1. Se utilizó el equipo de infrarrojo mencionado con una celda de 1 cm de paso óptico.

Las concentraciones se obtuvieron por interpolación con la curva mencionada. Los resultados fueron corregidos a masa seca midiéndose la pérdida de peso por desecación de una alícuota de muestra secada a 105°C durante 24hs.

Cromatografía gaseosa. El mismo extracto fue medido por cromatografía gaseosa con detector FID. Se utilizó un equipo Perkin Elmer Clarus 500. Las condiciones cromatográficas fueron:

- Columna HP-5, 30m de 0,25mm y 0,2µm de film.
- Temperatura inicial: 50°C
- Tiempo inicial: 5 minutos.
- Rampa: 50 - 300°C a 5°C/min.
- Tiempo a temp. final: 5min
- Temperatura de inyección: 300°C
- Temperatura de detector: 300°C
- Carrier: Nitrógeno 5.0 a 50ml/min.
- Volumen de inyección: 1µL.

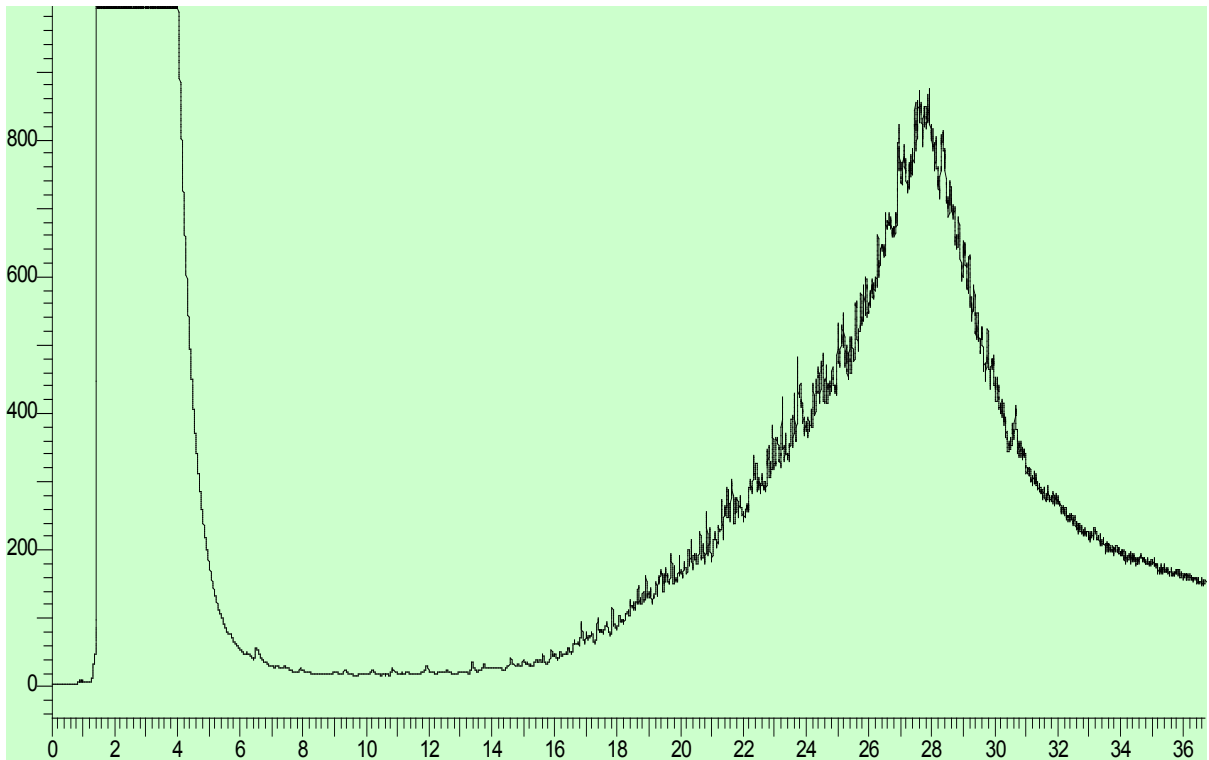
La concentración se la obtuvo por cálculo de la relación área / concentración respecto de soluciones estándares externos. Se utilizó mezclas de nafta y gas-oil comercial en diclorometano grado cromatográfico como se cita en el método EPA 8015B. Se utilizaron dos modos de integración: Valle/Valle (corresponde a cada pico eluido desde el comienzo al final de la elución); y Envolverte (se fuerza una línea de base como se indica en el método EPA 8015B).

Resultados. Los resultados que se presentan son tomados de una serie de datos de varios lotes de suelos sometidos a tratamiento por biorremediación.

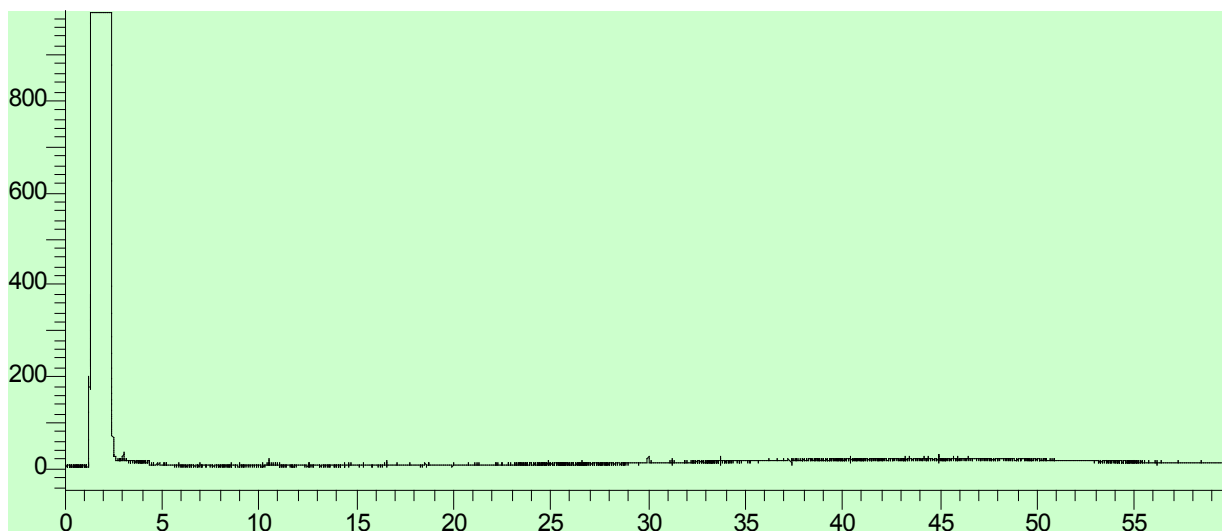
Comienzo del tratamiento. Día 0			
Parámetro	Técnica	Unidad	Valor
Hidrocarburos Totales	IR	mg/kg	33530
Hidrocarburos Totales (valle/valle)	CG-FID	mg/kg	3755
Hidrocarburos Totales (envolvente)	CG-FID	mg/kg	33500

Fin del tratamiento. Día 120			
Parámetro	Técnica	Unidad	Valor
Hidrocarburos Totales	IR	mg/kg	10240
Hidrocarburos Totales (valle/valle)	CG-FID	mg/kg	316
Hidrocarburos Totales (envolvente)	CG-FID	mg/kg	799

**Cromatograma de muestra del Día 0.**



### Cromatograma del Día 120



Indicadores biológicos. Al final del tratamiento se observa que los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos han alcanzado niveles similares a los de un suelo sin contaminar, la tasa respiratoria ha disminuido a valores compatibles con suelos estabilizados y no se observa fototoxicidad de acuerdo con la metodología propuesta por Vecchioli y Costanza (14).

Conclusiones preliminares. Es importante notar que al final del tratamiento los resultados de los hidrocarburos totales por infrarrojo aún permanecen elevados.

Las mediciones por cromatografía muestran resultados interesantes: en primer lugar los resultados valle / valle bajan un orden (desaparecen casi por completo los hidrocarburos cromatografiables) y respecto de la cuantificación por envolvente bajan en más de un orden y medio en el lapso de tratamiento estudiado.

Los resultados del contenido de hidrocarburos por infrarrojo en el día 120 no se correlacionan con los resultados de los indicadores biológicos y con los determinados por cromatografía gaseosa.

Finalmente es importante notar que si se toma solamente la medición por infrarrojo tendríamos un sitio con elevados niveles de contaminación por hidrocarburos, cuando se muestran evidencias que soportan al menos la ausencia de fitotoxicidad y bajos niveles de hidrocarburos cromatografiables.

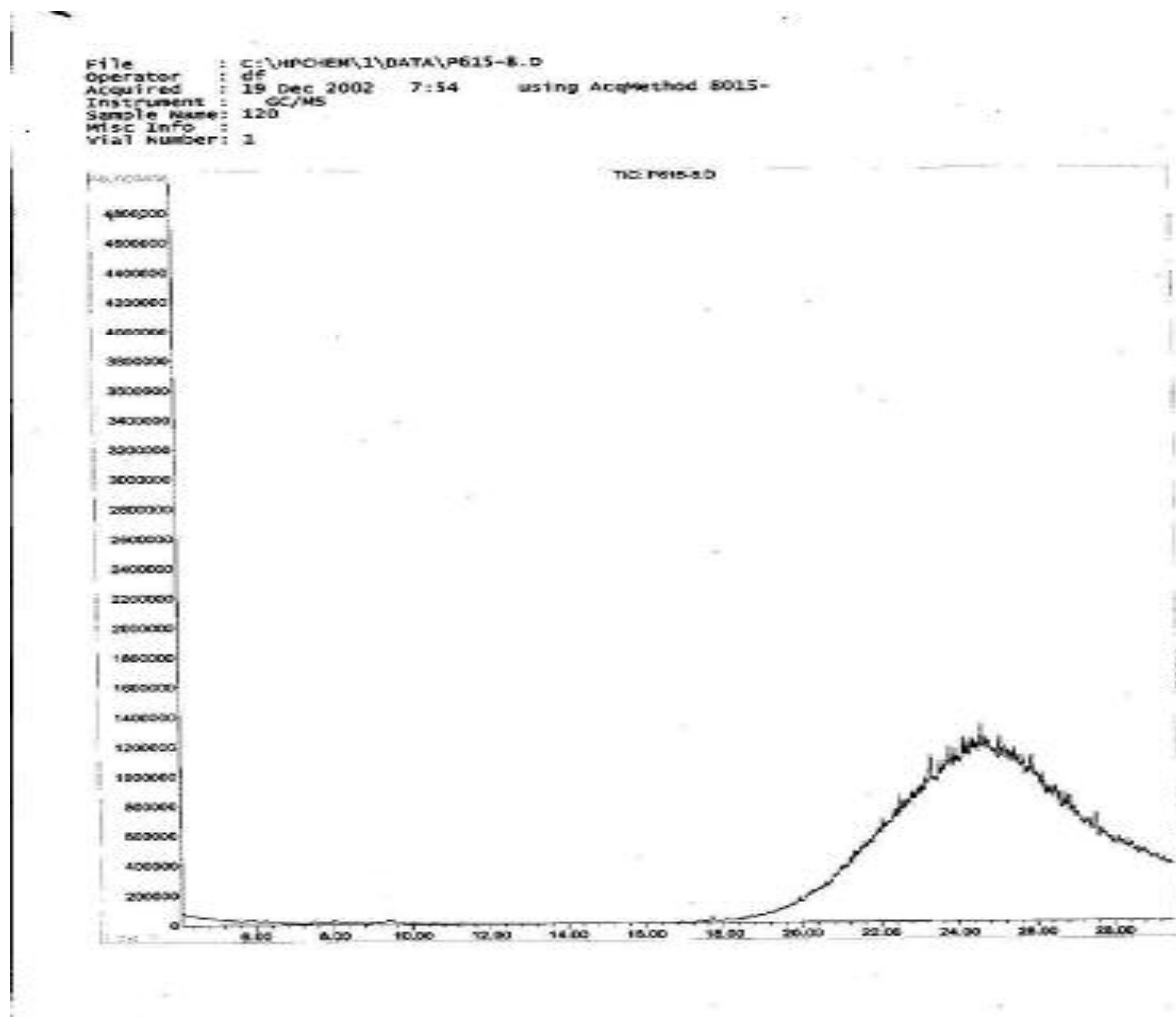
Se propone como causa de los elevados niveles de hidrocarburos, medidos por infrarrojo, a un déficit en el proceso de clean-up. A los 120 días de proceso, como consecuencia de la degradación de hidrocarburos, se han generado compuestos intermedios (polares y de otro tipo) y éstos no son eficientemente retenidos por el clean-up, pero dan alta señal a 2930  $\text{cm}^{-1}$  a pesar de no ser hidrocarburos (a 2930  $\text{cm}^{-1}$  se tiene la absorción de la unión C-H) como lo demuestran las determinaciones efectuadas por cromatografía.

Ensayos complementarios. Con el objeto de testear la propuesta mencionada en el párrafo anterior, se realizó un trabajo similar al expuesto sobre una muestra de un suelo biorremediado y se realizó una determinación por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas.

Las condiciones cromatográficas son similares. Se utilizó un equipo HP6890/MS5973 con impacto electrónico de 70eV.

Los espectros de masa de los picos eluidos fueron comparados en sus estructuras con las correspondientes a lo almacenado en la biblioteca de espectros NIST98 que provee el fabricante del equipo.

Se identificaron trazas de algunos biomarcadores (Colestanos y Norhopanos), como así también distintos compuestos con funciones oxigenadas que son indicadores de biodegradación en estado avanzado y severo (15).



La información relativa a la identificación de los picos mencionados más relevantes es:

RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
25.45	4.02	C:\DATABASE\NIST98.L Ergost-22-en-3-ol, (3.beta,5.alpha)	129025	036422-25-0	72
26.21	3.89	C:\DATABASE\NIST98.L 23,28-Bisnor-17.alpha.(H)-hopane	76329	1000101-35-1	64
26.72	3.51	C:\DATABASE\NIST98.L 28-Nor-17.beta.(H)-hopane	80569	036728-72-0	86
26.93	2.85	C:\DATABASE\NIST98.L			



Conclusiones. Las técnicas habitualmente usadas para la determinación de hidrocarburos totales (IR – GC) dan distinta información en cuanto a la composición de las mezclas complejas de hidrocarburos y sus productos de degradación y es aconsejable realizarlas en forma simultánea, sobre todo al final del proceso.

Para obtener resultados concordantes con los indicadores biológicos, tanto los extractos como los datos obtenidos deben procesarse en forma particular y no mediante los procesos estándares de uso habitual debido a que:

1. La limpieza con sílica gel efectuada sobre el extracto, previo a la medida por IR, es insuficiente para retener los compuestos polares y otros que no están ligados a la contaminación original y que se van generando durante el proceso biológico. Esto se pudo confirmar, al menos en forma preliminar en los ensayos complementarios al identificar biomarcadores y compuestos con funciones oxigenadas que pasaron por el proceso de clean-up.
2. La integración de picos resueltos en el perfil cromatográfico solo permite cuantificar una fracción de los hidrocarburos totales presentes en el extracto, mientras que la integración envolvente, forzando la línea de base al origen, asigna una concentración mayor pues involucra la fracción no resuelta del perfil (que puede incluir compuestos que no se corresponden con hidrocarburos). La concentración de hidrocarburos determinada por integración envolvente es similar a la obtenida por IR al inicio del tratamiento, sin embargo, al final del mismo, las diferencias observadas entre ambas metodologías de integración demuestran que la fracción no resuelta es biodegradable. Esto apoyaría que la señal obtenida por IR al final del tratamiento es consecuencia de productos de degradación que no pueden ser detectados por GC-FID cualquiera sea la integración utilizada

El monitoreo de los procesos de biorremediación mediante determinaciones químicas y biológicas realizadas en forma simultánea es necesario para evaluar la evolución del proceso y es imprescindible para definir el momento de finalizar las operaciones.

Recomendaciones. En virtud de lo descrito es recomendable ampliar estos trabajos focalizando en la mejora del procedimiento de clean-up y en la selección de técnicas de control microbiológico y de ensayos de fitotoxicidad en conjunto con los resultados analíticos.

#### Bibliografía.

- 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/index.htm>
- 11: Vecchioli G, Costanza O, Giorgieri S & M. Remmler. J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997,70, 331-336.
- 12: Vecchioli G, Costanza O. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 1999, 43, 56-59.
- 13: Vecchioli G, Costanza O. y S. Turquía. Comunicación personal.
- 14: Costanza O., Vecchioli, G. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 2000. 55:73-79 y 2000. 56:85-90.
15. Biological markers in sediments and petroleum. J.Michael Moldowan, Pierre Albrecht, R.Paul Philp. Prentice Hall, Inc. 1992.