

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Determinación de la degradación de biodiesel en suelo urbano por
medición de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) y evolución de
CO₂

Trabajo de investigación presentado por Giovanni Paolo Roverssi Sobrado
para optar el grado académico de Licenciado en Ingeniería Química.

Guatemala

2011

Determinación de la degradación de Biodiesel en suelo urbano por medición de TPH y evolución de CO₂

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE

GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Determinación de la degradación de Biodiesel en suelo urbano por medición
de TPH y evolución de CO₂


Trabajo de investigación presentado por Giovanni Paolo Roverssi Sobrado
para optar el grado académico de Ingeniería Química.

Guatemala

2011

Vo. Bo:


(f)



Ing. Gamaliel Zambrano
Asesor
Director Ingeniería Química
Colegiado No. 686

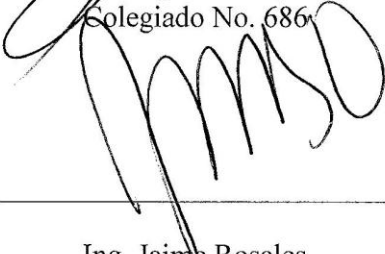
Tribunal

(f)



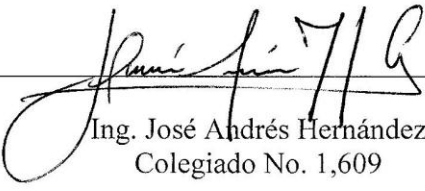
Ing. Gamaliel Zambrano
Director Ingeniería Química
Colegiado No. 686

(f)



Ing. Jaime Rosales
Colegiado No. 320

(f)



Ing. José Andrés Hernández
Colegiado No. 1,609

Fecha de Aprobación: 24 de Enero del 2011

PREFACIO

Se empezó a realizar los estudios de esta investigación hace más de tres meses esperando obtener resultados sobre la degradación del biodiesel, siendo éste un combustible verde , que se está utilizando cada día más. Desde hace un año que el tema de los biocombustibles aparece en todos los temas y hasta en prácticas de laboratorio sobre la producción de este a partir de grasas de la cafetería de la Universidad del Valle de Guatemala. Todos los análisis que sirvieron en esta investigación se llevaron a cabo en el laboratorio de Operaciones Unitarias en esta misma universidad.

Inicialmente se trató de hacer una investigación más grande, trabajando en triplicado cada muestra teniendo en total 30 sistemas para lo cual era necesario aproximadamente 60 botellas de PET para armar los sistemas. Siendo una gran cantidad de envases se optó mejor por realizar solamente una corrida por tipo de combustible o mezcla. Antes de empezar el muestreo fue necesario tener todo lo necesario para realizarlo, lo primordial era tener un suelo adecuado, tenía que ser un suelo de algún depósito de hidrocarburos o una gasolinera antigua. Se sabía que obtener un suelo así iba a ser difícil, por se agradece a mi gran amigo Alejandro Trabanino por proporcionarme el suelo deseado que tan difícilmente se me iba a hacer conseguir. De la misma forma se agradece a la Ing. Melissa Pacheco por proporcionarme gran cantidad de envases PET para montar los sistemas de degradación.

Teniendo todos materiales se empezó en el mes de Agosto con las pruebas en el laboratorio preparando todo lo necesario, en esta etapa de la investigación se agradece la ayuda del Ing. José Andrés Hernández Gaitán que ayudó optimizando el sistema para la medición de los datos y proporcionando un depósito de los envases PET para la prueba en el laboratorio de operaciones unitarias. Por último, pero no menos importante se agradece la ayuda aportada por el asesor el Ing. Gamaliel Zambrano, que oriento esta investigación durante el tiempo de realización.

ÍNDICE

No. PÁGINA

PREFACIO	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE GRÁFICOS	VIII
LISTA DE ILUSTRACIONES	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. ANTECEDENTES	3
IV. METODOLOGÍA	12
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	15
VI. JUSTIFICACIÓN	18
VII. OBJETIVOS	20
VIII. RESULTADOS	21
IX. DISCUSIÓN	25
X. CONCLUSIONES	34
XI. RECOMENDACIONES	36
XII. BIBLIOGRAFÍA	37
XIII. APÉNDICE	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Comparación de propiedades físicas y química entre el biodiesel y el diesel.....	6
Tabla 2 Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.....	7
Tabla 3 Nomenclatura para mezcla para cada sistema.....	14
Tabla 4 Muestras que se someterán a ANOVA.....	15
Tabla 5 Comparación de suelos.....	15
Tabla 6 Comparación de degradación y tasa de mineralización para el biodiesel y el diesel.....	21
Tabla 7 Degradación y tasa de mineralización del B20 y mezcla comparadas con el diesel.....	21
Tabla 8 Degradación y tasa de mineralización on bioestimulación.....	21
Tabla 9 Taza de mineralización para los dos tipos de suelo estudiados.....	22
Tabla 10 Resultados resumidos de ANOVA para comparaciones (90%) suelo óptimo.....	22
Tabla 11 Resultados resumidos ANOVA , 90% de confianza, tasa de mineralización.....	22
Tabla 12 Mililitros de HCl 0.04M para la titulación de KOH, determinación de suelo óptimo....	39
Tabla 13 Mililitros HCl 0.01M para titulación de KOH, degradabilidad evolución de CO2.....	39
Tabla 14 Pesos para la extracción por solvente.....	40
Tabla 15 Mililitros de KOH 0.01M que reaccionaron con el ácido carbónico, suelo óptimo.....	44
Tabla 16 Gramos de CO2 proveniente de la degradación de los hidrocarburos, suelo óptimo....	44
Tabla 17 Gramos de CO2 acumulados por día, determinación de suelo óptimo.....	45
Tabla 18 Datos de análisis por varianza , ANOVA, determinación de suelo óptimo.....	45
Tabla 19 Mililitros de HCl 0.01M para la titulación KOH, degradabilidad evolución de CO2....	46
Tabla 20 Gramos de CO2 proveniente de la degradación de los hidrocarburos.....	46
Tabla 21 Gramos de CO2 acumulados por día.....	47
Tabla 22 Porcentaje de remoción para suelos, prueba THP.....	47
Tabla 23 Análisis de ANOVA, comparación degradación diesel –B20.....	48
Tabla 24 Análisis de ANOVA, comparación degradación del diesel, con y sin bioestimulación .	48
Tabla 25 Hidrocarburos para el cálculo de TPH.....	49

Tabla 26 Hidrocarburos restantes y porcentajes remoción.....	49
Tabla 27 Estadísticas descriptivas	50
Tabla 28 Límites de TPHs para suelos comerciales para Nueva Zelanda	51
Tabla 29 Concentración máxima en suelo para el estado de California.....	51
Tabla 30 Límites permisivos de TPHs para suelos, en el Ecuador	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica 1 Mineralización Diesel, Biodiesel, B20 y mezcla Diesel-Biodiesel-Etanol	23
Gráfica 2 Degradación por método TPH.....	24
Gráfica 3 Evolución del CO2 para todas las muestra , suelo óptimo.....	52
Gráfica 4 Evolución de CO2 para suelo 1	53
Gráfica 5 Evolución de CO2 para suelo 2	54
Gráfica 6 Evolución de CO2 promedio para ambos suelos	55
Gráfica 7 Evolución de CO2 para muestras de biodiesel	56
Gráfica 8 Evolución de CO2 para muestras de diesel	57
Gráfica 9 Evolución de CO2 para muestras de diesel-biodiesel-etanol	58
Gráfica 10 Evolución de CO2 para muestras de B20.....	59

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Reacción obtención de biodiesel Technical Handbook for marine biodiesel.....	3
Ilustración 2 Sistema con el cual se midió la degradabilidad	16
Ilustración 3 Absorción del CO ₂ por el KOH	16
Ilustración 4 Depósito de tierra con hidrocarburo	17

RESUMEN

El biodiesel es un combustible verde que cada día se utiliza más y más . Su característica en la combustión lo hace un combustible ideal ya que reduce los gases de combustión dañinos a la atmósfera. Dado que su uso es más frecuente, la degradabilidad del mismo con el suelo es una característica importante de conocer. El biodiesel es combustible natural, un hidrocarburo natural que los microorganismos nativos del suelo asimilaban más rápidamente comparado al diesel. La bioestimulación consiste en una degradación biológica de un sustrato contaminante en un medio lleno de microorganismos. Dado que estos combustibles son a base de carbono, los microorganismos los consumirán para su desarrollo hasta la posible eliminación completa del contaminante. Este trabajo de investigación consiste en la evaluación de la degradación del biodiesel, diesel y sus mezclas en un medio de suelo urbano, por medio de análisis de TPHs, (hidrocarburos totales de petróleo) y por evolución de CO₂. Adicionalmente se trabajará con una bioestimulación para acelerar el proceso de degradación. El biodiesel presentó una tasa de mineralización de 3 g CO₂/día mientras que el diesel presentó una tasa de 1 g CO₂/día . Por otro lado la degradación por medio de TPH para el biodiesel presentó un porcentaje de remoción del 84.65% (de 400 000 a 61 393 ±44998mgTPH/kg suelo) para un tiempo de remoción total de 24 días, mientras que para el diesel se presentó un porcentaje de remoción del 57% (de 400 000 a 171 947 ±44998mgTPH/kg suelo) con un tiempo de remoción total de 35 días.

ABSTRACT

Biodiesel is a green fuel that is used every day more and more . Its combustion makes it an ideal fuel because reduces harmful exhaust gases into the atmosphere. Since its use is more frequent, its degradability on soil is an important feature to know. Biodiesel is, a natural fuel, that's why , the native microorganisms of the soil will assimilate it faster than diesel. Biostimulation is a biological degradation of a contaminant in a substrate full of microorganisms. Because these fuels are based on carbon, microorganisms consume them for their development. This research is the assessment of the degradation of biodiesel, diesel and mixtures thereof, on an urban land, by TPH analysis (total petroleum hydrocarbons) and CO₂ evolution. Additionally, this research, work with biostimulation to accelerate the degradation process. Biodiesel presented a rate of mineralization $3 \text{ gCO}_2/\text{day}$ while the diesel presented a rate of $1 \text{ gCO}_2/\text{day}$. On the other hand, the TPH degradation of the biodiesel present a clearance rate of 84.65% (from 400 000 to $61\,393 \pm 44998 \text{ mgTPH/kg ground}$) for a total removal time of 24 days, while for the diesel removal rate showed a value of 57% (From 400 000 to $171\,947 \pm 44998 \text{ mgTPH/kg floor}$) with a time of removal 35 days total.

I. INTRODUCCIÓN

El biodiesel es un combustible biológico, en estado líquido que se produce a partir de grasas y aceites naturales por medio de una esterificación y transesterificación de las mismas. Según EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), en su reporte “Office of Transportation and Air Quality” (EPA-420-F-10-009), febrero 2010, la venta de biodiesel desde el 2006 se ha triplicado a 700 millones de galones para su uso mezclado con el diesel común. Dado que su uso es más frecuente, la degradabilidad del mismo en el suelo es una característica importante de conocer. El biodiesel es combustible formado por hidrocarburos naturales que los microorganismos nativos del suelo asimilaban más rápidamente comparado al diesel. La bioestimulación consiste en una degradación biológica de un sustrato contaminante en un medio lleno de microorganismos. Dado que estos combustibles son a base de carbono, los microorganismos los consumirán para su desarrollo hasta la posible eliminación completa del contaminante. Este trabajo de investigación consiste en la evaluación de la degradación del biodiesel, diesel y sus mezclas en un medio de suelo urbano, por medio de análisis de TPHs, (hidrocarburos totales de petróleo) y por evolución de CO₂. Adicionalmente se trabajará con una bioestimulación para acelerar el proceso de degradación. Se espera que el biodiesel presente mayor degradación sin estimulación que el diesel, pero que al hacer la estimulación el diesel también tenga alto grado de degradabilidad.

II. HIPÓTESIS

A. Hipótesis de trabajo

El biodiesel B100 y B20, presentan un grado mayor de degradabilidad en un suelo urbano (taza de mineralización y porcentaje de remoción TPH) comparado al del diesel debido que es un hidrocarburo natural y los microorganismos asimilaran más fácil al biodiesel

B. Hipótesis nula

La degradabilidad del diesel, biodiesel B100 y B20 son similares debido a que son cadenas de hidrocarburos que los microorganismos asimilarían de igual manera sin importar ningún estímulo de minerales (N_2HPO_4 y NaCl)

C. Hipótesis alternativa

La estimulación biológica aumentara el ritmo de la degradabilidad del biodiesel B20, B100 y el diesel

III. ANTECEDENTES

A. BIODIESEL

Los componentes principales de las grasas y vegetales del aceite y animales son triglicéridos, los triglicéridos son ésteres de los ácidos grasos con el glicerol, el glicerol a menudo también se llama glicerina. Los triglicéridos de las grasas vegetales de aceite contienen ácidos grasos. Para obtener biodiesel, la grasa vegetal del aceite está sujeta a una reacción química llamada, trans-esterificación. Donde la grasa vegetal reacciona en la presencia de un catalizador con un alcohol para dar los ésteres correspondientes de los ácidos grasos de la grasa vegetal. (Martinez, 2008: 2)

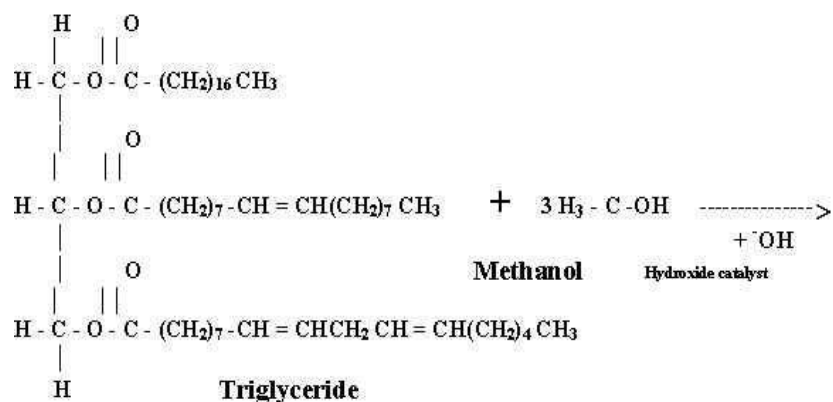
Químicamente la trans-esterificación rompe la molécula de la grasa vegetal convirtiéndose así en un Metil alcohol éster o Etil alcohol éster (según el alcohol utilizado) más glicerina. (Cabarcas, 2005: 5).

El biodiesel se utiliza típicamente como aditivo en una mezcla al 20% (B20) con diesel derivado del petróleo en motores de ignición y compresión (diesel). No obstante también se puede utilizar puro en motores diesel al 100% (B100), o en una proporción mucho más baja en forma de aditivo del 1 al 5 %. El biodiesel B20 tiene un 20% de bioesteraje, es decir, un 20% de ésteres grasos y un 80% de diesel petrolífero. Este es el tipo de diesel que han de consumir los vehículos que tengan las mangueras de caucho natural. Por su parte, el biodiesel B100 tiene un bioesteraje del 100%, es decir, solo contienen ésteres grasos y no contiene diesel. Este tipo de diesel solo lo pueden utilizar vehículos que tengan las mangueras de caucho sintético. (Chichilla, 2004: 22.)

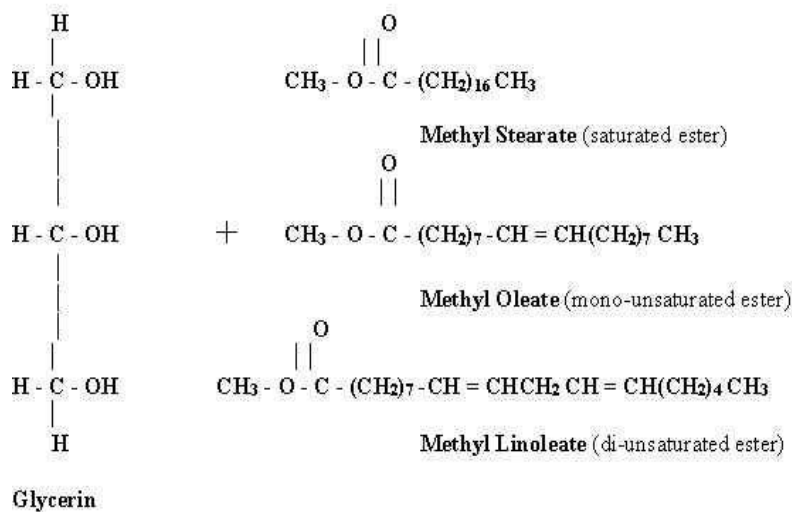
Ilustración 1 Reacción para la obtención de biodiesel según el Technical Hnadbook for marine biodiesel

How Biodiesel is Produced from Vegetable Oil:

Transesterification Reaction



Vegetable / Soybean Oil
(3 ester chains connected to glycerin)



Biodiesel Methyl Esters

B. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL BIODIESEL.

1. Ventajas del uso del biodiesel

- No requiere mayores modificaciones para su uso en motores diesel comunes, por lo tanto es compatible con los motores diesel actualmente comercializados.
- Miscible en todas las proporciones con el diesel , por lo tanto puede utilizarse en mezclas con diesel común en cualquier proporción.
- Confiere excelente propiedades de lubricidad al diesel
- Presenta un menor nivel de emisiones gaseosas de combustión nocivas, sobre todo la emisión de CO₂.
- Es obtenido a partir de aceites vegetales, totalmente renovables (Martinez, 2008 : 13)

2. Desventajas del Uso del biodiesel

- Su combustión puede acarrear un aumento de óxidos de nitrógeno (NOx)
- Si no se cuenta correctamente trasesterificado puede contener residuos ácidos.
- Poder calorífico menor al del diesel. (Martinez, 2008:14)

Tabla 1 Comparación de propiedades físicas y químicas entre el biodiesel y el diesel, USDOE 2000

Propiedades		
Estándar del combustible	ASTM D975	ASTM PS121
Composición del combustible	C10-C21 HC	C2-C22 FAME
Valor bajo de calentamiento (BTU/lb)	130,250	120,910
Viscosidad a 40°C	1.3-4.1	1.9-6.0
Densidad, lb/gal a 15°C	7.079	7.328
Carbón %/peso	87	77
Punto de ignición (°C)	60-80	100-170
Punto de congelación (°C)	-15 a 5	-3 a 12
Número de cetanos	40-55	48-60
Sulfuros (%/peso)	0.05 máximo	0
Gravedad específica Kg/l a 60°F	0.85	0.88
Oxígeno, por diferencia (%/peso)	0	11
Hidrógeno (%/peso)	13	12
Punto de ebullición (°C)	188-343	182-338

C. BIODEGRACIÓN

Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos en un combustible a base de petróleo (un 50-98% de la composición), por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales. Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o nparafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N y metales como el níquel y el vanadio, los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones, fracción saturada (n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), fracción aromática (monoaromáticos, diaromáticos y hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), fracción de resinas y fracción de asfaltenos que son menos abundantes y

consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (Viñas, 2005)

Tabla 2 Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo

Fracción	Composición
Saturados	<i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

(Viñas, 2005)

La biodegradación de hidrocarburos por poblaciones nativas de microorganismos representa uno de los principales mecanismos por el cual el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes son eliminados del ambiente.

La técnica de biorremediación, basada en el potencial biodegradativo natural de un suelo es comúnmente llamada “atenuación natural” o biodegradación intrínseca y es propuesta como una forma costo efectivo de remediación de bajo riesgo. (Cabarcas, 2005: 7).

El ambiente ejerce profunda influencia sobre las actividades microbianas. Muchos microbios son muy activos en ciertos ambientes, pero muy poco activos en otros. La tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos es afectado por varios parámetros

fisicoquímicos y biológicos que incluyen el número y tipos de microorganismos presentes, las condiciones de actividad de degradación microbiana como presencia de nutrientes, oxígeno, pH, presión, salinidad, temperatura, la calidad, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes y características del suelo como tamaño y distribución de partícula. El paso inicial en el catabolismo hidrocarburos por bacterias involucra la oxidación del sustrato por oxigenasas por lo que la concentración de oxígeno limita la biodegradación de petróleo en el suelo (y otros hidrocarburos en aguas subterráneas). La disponibilidad de oxígeno en el suelo es dependiente de la velocidad de consumo microbiano, el tipo de suelo y la presencia de sustratos utilizables que puedan conllevar a su consumo. (Cabarcas, 2005: 8).

Existen tres grupos de factores que condicionan la biodegradación microbiana de hidrocarburos, los relacionados con las características del producto petrolífero, los relacionados con el medio y los relacionados con los microorganismos presentes en el emplazamiento. Si bien los microorganismos pueden degradar una parte importante de un crudo de petróleo, tienen preferencias por algunos hidrocarburos. Los crudos de petróleo están formados por cuatro familias de compuestos o fracciones: los hidrocarburos alifáticos, los hidrocarburos aromáticos, las resinas y los asfaltenos. Los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen menos de 28 carbonos, aunque se han llegado a describir biodegradaciones de hidrocarburos de hasta 44 carbonos. Los isoprenoides, y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales. Respecto a los hidrocarburos aromáticos, a medida que aumenta el número de anillos y los sustituyentes alquilo, por tanto, su peso molecular, aumenta su resistencia a la biodegradación. (Solanas, 2009: 2)

Otro aspecto importante relacionado con las características de los productos petrolíferos son su hidrofobicidad y su facilidad para adsorberse en partículas del suelo como las arcillas o absorberse o en la materia orgánica. Estos fenómenos, así como la difusión en micro poros dan lugar a una disminución de su biodisponibilidad hacia los microorganismos que deben degradarlos. (Solanas, 2009: 2)

El medio donde se encuentra el contaminante debe proporcionar las mejores condiciones a los microorganismos para que su actividad metabólica sea la adecuada para degradar los hidrocarburos. En el caso de los hidrocarburos, aunque existen microorganismos que pueden degradarlos anaeróbicamente, sabemos que el metabolismo más eficaz es el aeróbico por lo que la presencia de oxígeno será un requisito imprescindible. En el caso de la zona no saturada del suelo, una variable muy importante es la humedad que deberá encontrar un valor óptimo entre aquel que requieren los microorganismos para su metabolismo y el que permita una buena aireación. (Solanas, 2009: 4)

La transformación ideal de los hidrocarburos por parte de los microorganismos es la mineralización, que supone que el microorganismo utiliza el contaminante como sustrato de crecimiento. Pensemos que los hidrocarburos sólo contienen carbono (C) e hidrógeno (H), mientras que una célula microbiana contiene C, nitrógeno (N), fósforo (P), además de otros micronutrientes, en unas proporciones determinadas. Para que el microorganismo pueda crecer a expensas de los hidrocarburos deberá disponer en el medio de las proporciones necesarias de N y de P además del C y H. Es por ello que en medios pobres en N y P se necesitará suplementar con nutrientes o fertilizantes. (Solanas, 2009: 5)

Por lo que respecta a los factores relacionados con los microorganismos, se define el período de aclimatación como aquel tiempo que requieren las poblaciones microbianas presentes en un emplazamiento para empezar a degradar los contaminantes. En este sentido, se conocen distintos factores que pueden disminuir o aumentar este tiempo pero en términos generales están relacionados con el historial de contaminación del emplazamiento. Si la contaminación es remota los microorganismos están muy adaptados a la presencia de los contaminantes y pueden dar una respuesta rápida a una bioestimulación sin prácticamente un período de aclimatación. En el caso de contaminaciones accidentales, este período podría alargarse. Sin embargo, cabe señalar que en el caso de la contaminación por hidrocarburos, al tratarse de unos contaminantes

prácticamente omnipresentes, en su presencia en la atmósfera, se ha podido constatar que se encuentran microorganismos degradadores de hidrocarburos en prácticamente cualquier emplazamiento. (Solanas, 2009: 5)

D. LOS MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN LOS HIDROCARBUROS

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir. En el caso de los hidrocarburos, las bacterias gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono. Diversos estudios permiten hoy en día establecer una lista de 160 géneros de microorganismos que degradan los hidrocarburos, los consorcios más empleados contienen las especies *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. (Braibant, 2004: 10)

El suelo es un medio complejo orgánico y/o mineral en el que muchas condiciones determinan la variabilidad de la microflora. La biodegradación de los hidrocarburos se realiza de preferencia a una temperatura entre 15 y 30°C. Visto la complejidad del suelo, deben controlarse también el pH, los nutrientes, la disponibilidad de oxígeno y del contaminante. (Braibant, 2004:10)

La biodisponibilidad de los hidrocarburos es esencial para su descomposición. La adición de agentes de superficie (surfactantes o emulsificantes) permite mejorar esta disponibilidad (Harris, 1997). Cuando los microorganismos producen sus propios surfactantes, en general, al principio de la fase estacionaria de crecimiento, se recomienda

no agregar emulsificantes sintéticos debido a que sus efectos sobre la actividad microbiana aún no son claros. (Braibant, 2004: 10)

1. Parámetros indicadores de la metabolización de los hidrocarburos. La oxidación de los hidrocarburos produce ácidos grasos que son utilizados por las bacterias o liberadas en el medio. Si éste es el caso, el pH del medio disminuye. Esta acidificación se emplea como parámetro para evaluar la degradación, junto con:

- El incremento de la población microbiana a lo largo del tiempo es el resultado del consumo de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Este aumento de población puede visualizarse al medir la turbidez del medio (la densidad óptica), la evolución de la materia seca y la viabilidad (UFC/ml) en el tiempo
- La disminución de la concentración de hidrocarburo en el medio puede ser un segundo indicador de la degradación. Si la población logra utilizar el contaminante como fuente de carbono, la concentración del mismo debe disminuir con el tiempo y ser reemplazado en el medio por nuevos metabolitos. La determinación de la concentración puede hacerse por métodos analíticos (cromatografía, absorción IR) o de Immunoassay (kitenzimáticos).
- La evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno puede también constituir un indicador de la actividad de degradación que realizan los microorganismos sobre las fuentes de carbono empleando al oxígeno como aceptor de electrones. Una prueba respirométrica puede llevarse a cabo sobre un suelo contaminado en presencia de microorganismos

(Braibant, 2004: 25)

IV. METODOLOGÍA

El método de evolución de CO_2 arroja resultados indirectos de la degradación de hidrocarburos por medio de la tasa de mineralización, esta expresa el consumo de las cadenas de carbono por medio de los microorganismos, dado que es un proceso biológico los microorganismos al consumir carbono excretan CO_2 , mientras que el método TPH, mide directamente los gramos de hidrocarburos degradados por kilogramo de suelo. Para la realización de este trabajo se creó un sistema para la medición indirecta de la degradación del biodiesel (Ilustración 2). Para esto se utilizó $1.13 \pm 0.001 \text{g}$ de KOH, para obtener una solución de 0.01 M KOH, de esta solución se depositaron $200 \pm 0.01 \text{ml}$ en un recipiente PET de 600ml (Ilustración 3) para que absorbiera el CO_2 liberado por los microorganismos al consumir los hidrocarburos. Por otro lado, en un envase PET de 3L se deposita la tierra contaminada, de este lado se obtiene las muestras para las pruebas de TPH (Ilustración 4). En el caso del método de evolución de CO_2 se titularon muestras de 10 ml de la solución 0.01M de KOH con soluciones de HCl 0.04 molar para el caso de determinación del suelo óptimo y 0.01M para el experimento de determinación de degradabilidad en sí.

A. Evolución CO_2 (EPA 560/6-82-003)

Dentro del sistema se presentaron distintas reacciones químicas, en las cuales se basó esta investigación para obtener indirectamente la cantidad de CO_2 . La primera reacción presente en el sistema fue la creación de ácido carbónico, el CO_2 expulsado por los microorganismos reacciona con el agua en la solución de KOH 0.01 M provocando la siguiente reacción, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$, el ácido carbónico al mismo momento empieza a reaccionar en una reacción de neutralización con el KOH presente, siguiendo la siguiente ecuación, $2\text{KOH} + \text{H}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{K}_2\text{CO}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}$. Para la titulación se utilizan alícuotas de 10ml de la solución de KOH y se titulan con HCl. La diferencia de ml de HCl utilizados para titular la muestra de 10ml de KOH en el tiempo cero y los 10ml de KOH en el tiempo 5, 10,15,20 días equivalen a los ml de KOH que reaccionaron con el ácido carbónico. Partiendo de estos ml de KOH y con las reacciones ya mencionadas se calculan los gramos de CO_2 generados (ecuación no 2). Se necesitó un control de la producción de CO_2 dado que los microorganismos autóctonos del suelo producen CO_2 sin importar la presencia de hidrocarburos y el CO_2 ambiental también se asumen presente en este

blanco. Descartando este valor se obtiene el CO_2 producido de la ingesta de hidrocarburos por parte de los microorganismos.

B. Medición TPH (EPA 821-B94-004, 1995)

La medición de degradabilidad por el método de TPH, consiste en medir los hidrocarburos totales de petróleo presentes en la muestra de tierra. Existen métodos por medio de cromatografía y métodos por medio de extracción. En este caso se trabajó con el método EPA 821-B94-004, 1995 para la medición de TPH (mg TPH /kg suelo) presentes, el porcentaje de remoción y el tiempo para la remoción total. Este método consiste en tomar una muestra de suelo previamente pesada y tratarla con hexano durante cierta cantidad de horas, en este caso se trabajó durante 8 horas de extracción. La muestra se trató con hexano y se agito para después ser calentada para evaporar el solvente, esto se repitió durante 8 horas, cada 30min a una temperatura de 80 °C. El hexano es un conocido solvente orgánico, este al estar en contacto directo con la muestra extrae todas las sustancias solubles en el que contenga la muestra. Los hidrocarburos en la muestra son arrastrados por el hexano y así después de las 8 horas, se hace otro pesado y la diferencia de pesos, equivale a los gramos de hidrocarburos presentes en la muestra. Por medio de la ecuación no 6, se determina la cantidad de TPH presentes en la muestra. Estos valores también se utilizaron para determinar el porcentaje de remoción de hidrocarburos en la muestra, por ende en el sistema entero. Con los valores de remoción se calculó cuántos gramos de combustible fueron degradados por la muestra en 20 días, y así obteniendo la tasa de degradación de gramos de hidrocarburo por día se estimó los días en que la contaminación sería removida totalmente.

1. Obtención de materiales a analizar

- Obtención del biodiesel producción en el laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala a partir de manteca ya utilizada.
- Obtención de las muestras de tierra.

2. Preparación de muestra de tierra con biodiesel

- Obtención de la tierra

- Homogenización de la tierra
- Muestra de humedad y Ph

3. Puesta en marcha de análisis

Tabla 3 Nomenclatura para mezcla para cada sistema

	Contaminación
A	400g/Kg de biodiesel
AB	400g/Kg de mezcla B20
B	400mg/Kg de diesel
ABC	400mg/Kg de biodiesel-diesel-alcohol
A*	400mg/Kg de biodiesel con bioestimulación
AB*	400mg/Kg de mezcla B20 con bioestimulación
B*	400mg/Kg de diesel bioestimulación
ABC*	400mg/Kg de biodiesel-diesel-alcohol con bioestimulación
Z	Control
Z*	Control con bioestimulación

- La tierra se deposita en botellas pet de 2.5 a 3 lt , durante 20 días, se toman muestras cada 1, 5, 10, 15, y 20 días para análisis de CO₂ y para análisis de TPH una medición al final de los 20 días.
- Para TPH s, se adquieren muestras de 20g disueltas en 50ml de hexano para después ser leídas en un cromatografía de gases.
- Para el análisis de evolución de CO₂, se utiliza un absorbente de CO₂, KOH 0.01m , que después se titula con HCl 0.01M
- En cada sistema se depositarán 200ml de la muestra de KOH 0.01M

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Dentro de un rango de 20 días, para la medición de TPHs cada 20 días y para la medición de evolución de CO₂ cada 5 días. Teniendo un total de 10 recipientes para la incubación de los cuales se tomaran 10 muestras para los análisis de TPHs y CO₂ con un total de 40 muestras. Se comparará de la siguiente forma por medio de un análisis de varianza:

Tabla 4 Muestras que se someterán a ANOVA

Muestra 1	Muestra 2
AB	B
ABC	AB
B	B*

Tabla 5 Comparación de suelos

Muestra	Suelo
1	Finca fraijanes
2	Gasolinera Puerto

Ilustración 2 Sistema con el cual se midió la degradabilidad



Ilustración 3 Absorción del CO₂ por el KOH



Ilustración 4 Depósito de tierra con hidrocarburo



VI. JUSTIFICACIÓN

El biodiesel es un combustible biológico, en estado líquido que se produce a partir de grasas y aceites naturales por medio de una esterificación y transesterificación de las mismas. Se puede producir a partir de grasa y aceites previamente usados en otro tipo de industrias. El valor del combustible en todo tipo de industria significa un rubro prioritario en sus gastos, por lo cual la fluctuación del precio del mismo es muy significativa en los costos de producción. El uso del combustible en la industria se enfoca en los motores de combustión interna que son utilizados en infinidad de actividades. Mayormente estos motores trabajan con diesel, un combustible derivado del refinado de petróleo. De la misma forma el valor de los combustibles afecta a miles de personas que utilizan también motores de combustión interna para la movilidad de sus vehículos.

El uso de un combustible más barato es la única salida para no ser tan influenciados por el precio del petróleo, es por esto que se empezó a investigar en nuevas fuentes de energía, una de estas, el biodiesel, un combustible de fuente natural. Según EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), en su reporte “Office of Transportation and Air Quality” (EPA-420-F-10-009), febrero 2010, la venta de biodiesel desde el 2006 se ha triplicado a 700 millones de galones para su uso mezclado con el diesel común. Los combustibles a base de petróleo también producen emisiones de carbono que contribuyen a los gases de invernadero, principales actores en el calentamiento global, un aspecto ambiental reconocido mundialmente. Por lo que también se buscan otras fuentes de energía verde o no contaminante, una de estas fuentes es el biodiesel, que reduce las emisiones de carbono en su combustión y no depende en el mercado del petróleo.

Dado que el uso del biodiesel se está convirtiendo en un hecho masivo, conocer todas las propiedades físicas, químicas, térmicas y fisicoquímicas de este combustible es prioritario para analizar sus alcances totales. La degradabilidad es un factor del biodiesel que se está empezando a estudiar, para conocer posibles consecuencias del contacto del combustible con el suelo y anticipar posibles contaminaciones cuales fueran sus causas.

La contaminación con hidrocarburos en el suelo provoca una serie de impactos en el equilibrio del ecosistema. Un derrame de hidrocarburos en el suelo, satura el mismo, cambia las propiedades químicas y a su vez afecta a los seres vivos que coexisten en el suelo. Los derrames de hidrocarburos se dan a un nivel de toneladas de crudo derramado abarcando grandes cantidades de tierra, los sectores más afectados con contaminación de hidrocarburos en el suelo, son viejas refinerías, viejos depósitos y gasolineras. Al tener contacto con el suelo los hidrocarburos aumentan la cantidad de carbono orgánico presente, disminuyen el pH del suelo y al ser derramados son absorbidos por el suelo y forman una capa que impide el intercambio de gases con la atmosfera; por último los hidrocarburos degradan proteínas, deshidratan enzimas y provocan una gran gama de reacciones negativas para los microorganismos que habitan en el suelo.

Remediar el contacto de los hidrocarburos con el suelo es una actividad que se debe de realizar inmediatamente, existen muchos métodos de remediación de suelos, por agentes químicos, por absorción del hidrocarburo, lavado del suelo y por introducción de aire. Todos estos métodos son relativamente caros e introducen agentes ajenos al suelo que pueden llegar a cambiar la estructura de vida en él, el método que la degradación del hidrocarburo por el suelo, es el método más “limpio” que se pueda utilizar y de menor costo. Pero antes de poder entrar en el área de remediación es necesario conocer las características de degradación del hidrocarburo y como mejorarlas. El biodiesel y el diesel son hidrocarburos de diferente fuente pero que se utilizan para el mismo objetivo, energía. Conocer el tiempo de degradación del biodiesel en el suelo es el primer paso para un proceso de remediación de suelo, de la misma forma conocer el efecto que tiene el biodiesel en la degradación del diesel es un factor a considerar si se necesita remediar suelos contaminados con diesel y mejorar el tiempo de degradación.

VII. OBJETIVOS

A. Generales

- Determinación de la degradación del biodiesel en un suelo urbano por medio del método de TPH
- Determinación de la degradación del biodiesel en un suelo urbano por medio del método de evolución de CO₂

B. Específicos

- Determinar el suelo óptimo para el análisis de degradación y sus características (humedad y pH)
- Medición de la degradación del biodiesel por medio de evolución de CO₂ con y sin bioestimulación, por medio de titulación.
- Medición de la degradación del biodiesel por medio TPHs con y sin bioestimulación por medio de extracción con solvente (hexano)
- Comparar la degradabilidad del Diesel con la degradabilidad del B20 por medio de un análisis estadístico
- Evaluar la degradabilidad del diesel, biodiesel B100, B20 y mezcla Biodiesel-diese-etanol
- Determinar el porcentaje de remoción de TPHs en las muestras y el tiempo de degradación de las mismas.

VIII. RESULTADOS

Tabla 6 Comparación de degradación y tasa de mineralización para el biodiesel y el diesel

	Biodiesel		Diesel	
Taza de mineralización $\text{g } CO_2/\text{día}$	3		1	
Degradación ($\pm 44998\text{mgTPH/kg suelo}$)	400 000	61 393	400 000	171 947
% de remoción	84.65		57.01	
Días para la degradación total (± 1.5 días)	24		35	

Tabla 7 Degradación y tasa de mineralización del B20 y mezcla diesel-biodiesel-etanol comparadas con el diesel

	Taza $\text{g } CO_2/\text{día}$	Degradación ($\pm 44998\text{mg TPH/kg suelo}$)		% remoción	Días para degradación total (± 1.5 días)
Diesel	1	400 000	171 947	57.01%	35
B20	3	400 000	80 025	79.99%	25
Biodiesel-Diesel-Etanol	3	400 000	84 806	78.80%	25

Tabla 8 Degradación y tasa de mineralización del biodiesel, diesel, B20 y mezcla diesel-biodiesel-etanol con bioestimulación

	Taza $\text{g } CO_2/\text{día}$	Degradación ($\pm 44998\text{mg TPH/kg suelo}$)		% remoción	Días para degradación total (± 1.5 días)
Biodiesel	4	400 000	17 874	95.53%	21
Diesel	3	400 000	108 007	73.00%	27
B20	3	400 000	57 692	85.58%	23
Biodiesel-Diesel-Etanol	4	400 000	65 341	83.66%	24

Tabla 9 Taza de mineralización para los dos tipos de suelo estudiados

Suelo	Taza $g^{CO_2}/día$
1	2
2	3

Tabla 10 Resultados resumidos de ANOVA para comparaciones (90%), suelo óptimo

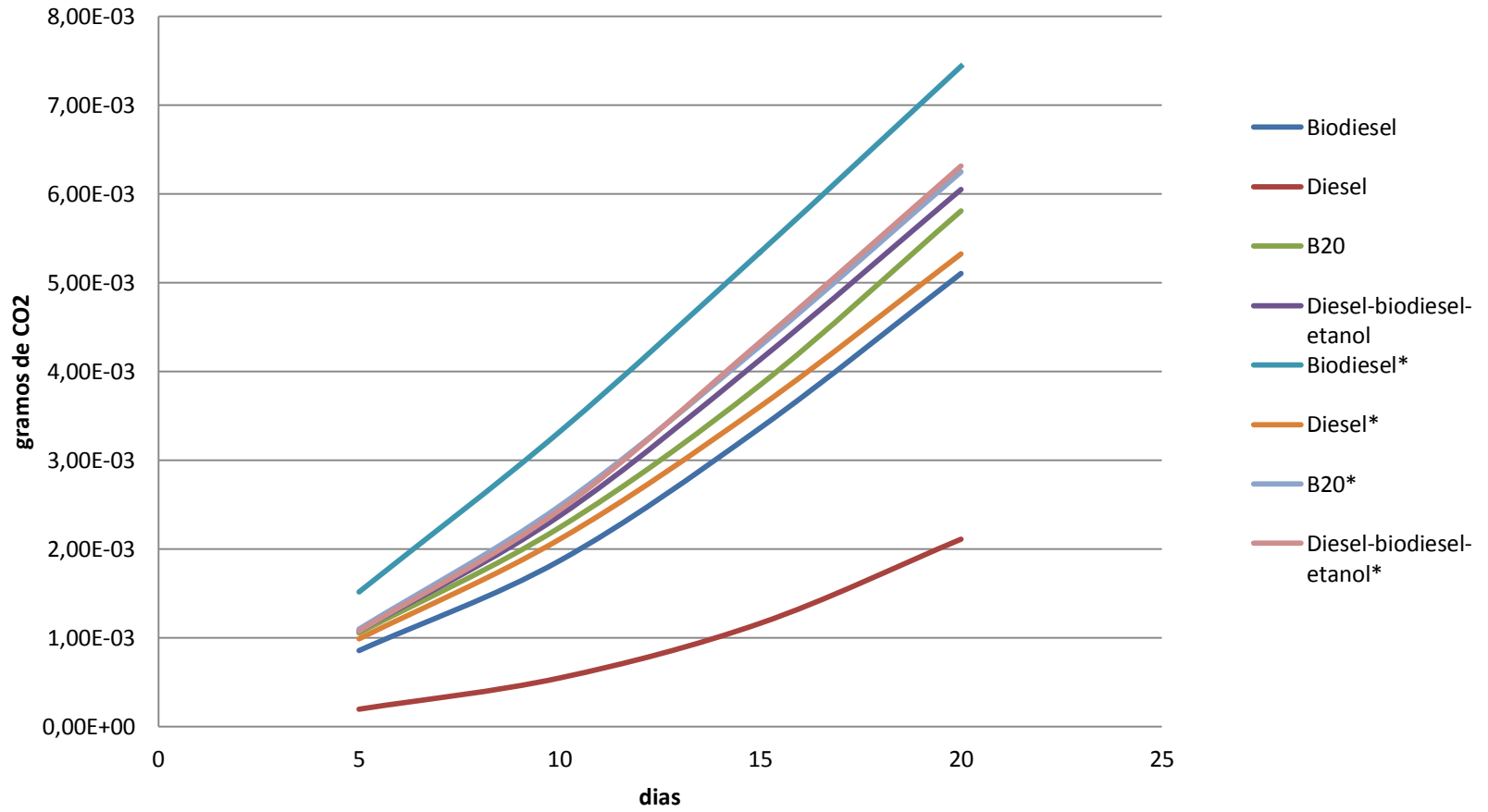
Taza de mineralización	Promedio $g^{CO_2}/día$	Varianza $g^{CO_2}/día$	Valor-P
Suelo 1 prom	0.00143766	1.06916E-06	0.098949186
Suelo 2 prom	0.00374085	4.50647E-06	

Tabla 11 Resultados resumidos de ANOVA para comparaciones 90% de confianza, taza de mineralización.

Taza de mineralización	Promedio $g^{CO_2}/día$	Varianza $g^{CO_2}/día$	Valor-P
Diesel	0.0010065	7.03212E-07	0.091393054
B20	0.0032395	4.24287E-06	
Diesel	0.0010065	7.03212E-07	0.099694944
Diesel con estimulación	0.0030085	3.533E-06	

Gráfica 1 Mineralización diesel, biodiesel, B20 y mezcla diesel-biodiesel-etanol

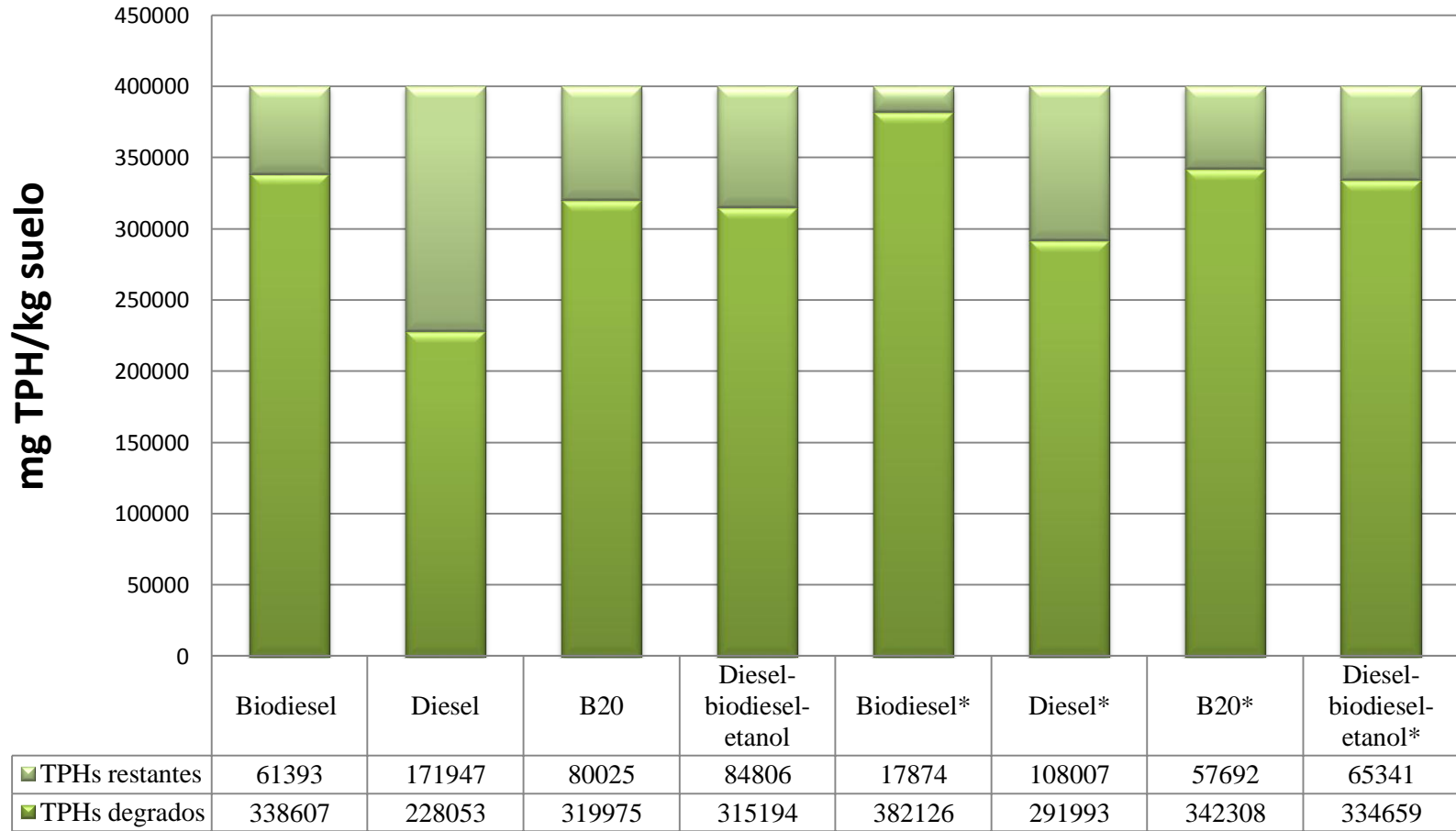
Evolucion de CO2 para todas las muestras



*Muestra con bioestimulación

Gráfica 2 Degradación por método TPH

Degradacion por metodo TPH



*Muestra con bioestimulación

IX. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la degradación del biodiesel por medio de dos métodos, método de TPH (hidrocarburos totales presentes) y método de evolución de CO₂. Ambos métodos son utilizados formalmente para la medición de degradación. El método para la determinación de degradación por medio de TPH, se realiza por medio de extracción por solvente (Adaptación EPA 821-B94-004, 1995) mientras que el método de evolución de CO₂ se realiza por medio de titulación ácido-base (Adaptación EPA 560/6-82-003). Además de determinar la degradación natural, también se determinó los efectos de una bioestimulación en la degradación, que de igual forma se midieron con los métodos anteriormente mencionados.

Como ya se mencionó es sumamente tóxico para el suelo tener contacto con hidrocarburos en grandes cantidades, provocando una inestabilidad química que tienen consecuencias en los seres vivos que habitan el suelo. La degradación es un proceso biológico, donde el consumo de las cadenas de carbono por los microorganismos es la reacción principal. Un proceso de degradación de hidrocarburos tendría como consecuencia directa la eliminación del mismo y sus efectos tóxicos en el suelo. En un derrame de hidrocarburos, estos forman una capa que impide la respiración del suelo y su interacción con la atmósfera, con la degradación como se demostrara posteriormente, se incrementa la producción de CO₂, esto indica que en el proceso de degradación se empieza a equilibrar esa respiración o intercambio de gases con el ambiente. Por otro lado los hidrocarburos también saturan el suelo, aumentando la humedad y creando un desequilibrio que afecta a los microorganismos, el consumo de estos regulará ese cambio de humedad. Por último según Cabarcas, 2005, en su investigación “Degradación de biodiesel y diversidad bacteriana en suelos arenosos en una zona industrial”, el incremento de la densidad bacteriana se mira afectado pero no como lo esperado, se hizo un control de las bacterias presentes y se catalogaron, se monitorio principalmente dos grupos, las heterótrofas y las degradadoras. Después del estudio de la degradación durante 41 días, se encontró que el aumento en la población bacteriana se dio por parte de las bacterias degradadoras y no de las heterótrofas, estas últimas disminuyeron en su población. La degradación aumenta la población bacteriana de ciertas bacterias que tienen la capacidad de degradación pero disminuye el crecimiento de bacterias ajenas al consumo del hidrocarburo.

A. Determinación del suelo óptimo

La degradabilidad del combustible depende directamente de los microorganismos presentes en el suelo, dado que son ellos los que consumen las cadenas de hidrocarburos para su ciclo de vida. Inicialmente se trabajó con la suposición de que los microorganismos que recibían más fuentes de hidrocarburos iban a estar predispuestos a asimilarlos y consumirlos más fácilmente que los microorganismos ajenos al contacto de hidrocarburos. Por lo cual se optó por obtener muestras de tierra, muestras totalmente diferentes entre sí, hablando directamente en el contacto con hidrocarburos. Ambas muestras fueron tratadas con hidrocarburos para así seleccionar el suelo más óptimo para la degradación de los mismos. La primera muestra (1) fue obtenida directamente del suelo a 10cm de la superficie, en una finca localizada en la municipalidad de Fraijanes, Guatemala. Se escogió esta zona ya que está alejada del casco municipal y capitalino así que no recibirá mucha influencia de hidrocarburos. Por otro lado, la siguiente muestra (2) fue obtenida en un sector propenso a derrames de hidrocarburos, una gasolinera, ubicada en la Avenida 30 de Junio, zona 1 Puerto de San José, Escuintla, esta gasolinera fue expuesta a varios derrames de hidrocarburos debido al descuido de sus dueños anteriores, de igual manera se extrajo muestras del suelo a 10cm de la superficie.

Como se mencionó anteriormente se tuvo que determinar cuál sería el suelo óptimo para la medición de degradabilidad. Es importante antes mencionar que la selección de un suelo adecuado determinaría el éxito de esta investigación. Un suelo acostumbrado a recibir fuertes cargas de hidrocarburos es el más óptimo para este experimento. Esta suposición no es suficiente para empezar a utilizar una muestra de suelo, se necesitó un respaldo estadístico, por lo cual se hizo un pre experimento de degradación con las dos muestras de suelo 1 y 2. Tomando como hipótesis que existe una diferencia estadística en el uso de los suelo y como hipótesis nula la no existencia de una diferencia en el uso del suelo. (Ver Tabla No. 5)

Para este sistema se utilizaron 600 ± 0.01 gramos de suelo y 130 ± 0.01 gramos de biodiesel proveniente de la grasa de cocinas, producido en el laboratorio de operaciones unitarias, de la Universidad del Valle. La cantidad de gramos se estimaron a partir de tomar en cuenta el valor de confianza 90%, y su valor Z y e correspondiente. Se trabajó solamente con biodiesel en este pre experimento dado que es el hidrocarburo que se en esta investigación se le quiere determinar su degradabilidad. El método de evolución de CO_2 fue suficiente para el pre experimento dado que sus resultados arrojan la actividad microbiana en el consumo del

hidrocarburo. Se crearon 8 sistemas como la Ilustración no 2, 3 sistemas con muestras de suelo 1 y 3 sistemas con muestras de suelo 2 y 2 sistemas de control uno para cada muestra de suelo.

Las pruebas se hicieron durante 20 días, tomando alícuotas de 10ml de la solución de KOH , estas se titularon con HCl, 0.04M(2 litros) , para lo cual se utilizó 3.27 ± 0.05 ml de una solución de HCl al 38% grado reactivo. En la titulación se utilizó fenolftaleína como indicador de la neutralización del KOH por medio del HCl, los resultados de las titulaciones se pueden encontrar en la Tabla 12. . Como se mencionó anteriormente los ml de HCl se utilizaron para determinar los ml de KOH que no reaccionaron con el ácido carbónico, siguiendo la estequiometria, se calcularon según la ecuación no 1, os ml de KOH que no reaccionaron se pueden ver en la Tabla 15. De igual manera por estequiometria se calcularon los gramos de CO₂, ecuación no 2 . Los gramos de CO₂ fueron en aumento en cada toma de muestras, como se puede apreciar en la Tabla no 16, este aumento significo que el consumo de hidrocarburos por medio de las bacterias también aumentó.

Los microorganismos necesitan destruir las cadenas de hidrocarburos a un estado más simple para poder consumirlas, llevar a estas cadenas a un estado simple como el carbono lleva tiempo para los microorganismos en lograrlo. Esto puede explicar el aumento de CO₂ durante los 20 días, ya que en el último día para todas las muestras el CO₂ aumento en la alícuota de 10ml, para ese tiempo los microorganismos ya sintetizaron las cadenas de hidrocarburos y se les fue más fácil consumirlo y es por esto el aumento en la producción de CO₂.

Para obtener una tasa de degradación del biodiesel en esta prueba se realizó una gráfica de gramos de CO₂ vr tiempo. La pendiente de esta gráfica es el valor de la tasa de mineralización, un método directo para controlar el consumo de los microorganismos. Ya que previamente se le eliminó el valor del control a cada suelo para descartar el CO₂ ambiental y el CO₂ que producen los microorganismo en su ciclo natural, se obtuvo una tasa de mineralización provocada por la inserción del hidrocarburo y el consumo del mismo por los microorganismos.

Se trabajó con valores promedios a partir de las tres muestras para casa suelo, para obtener un valor homogéneo de la tasa de mineralización. De todas maneras se graficó todas las muestras como se puede ver en la gráfica 3. En esta gráfica se aprecia como las muestras del suelo 2, el suelo más acostumbrado a recibir hidrocarburos presenta una mayor producción de CO₂. Entre las muestras del suelo 1, la muestra #3 y #2 presentaron mayor producción de CO₂

con una tasa de $2\text{mg } CO_2/\text{día}$ mientras que la muestra #1 $1\text{mg } CO_2/\text{día}$, dado que no se garantiza que la misma cantidad de microorganismo estuviera presentes en todas las muestras o que su comportamiento fuera el mismo, estas diferencias eran esperadas (Gráficas 4 y 5). Para el suelo 2, las tres muestras reflejaron una tasa de mineralización de $3\text{mg } CO_2/\text{día}$ esto puede ser explicado dado que la tierra del suelo 2 es una suelo arenoso y muy fino, esto fomenta la homogenización de la misma y por ende de los microorganismos, teniendo entonces en cada muestra la misma cantidad relativa de microorganismos, lo cual se vio reflejado con la misma tasa de mineralización.

La tierra 2 presentó una mayor tasa de mineralización, ósea un consumo mayor de hidrocarburo, en este caso biodiesel. Pero para obtener un resultado más general se graficaron los promedios de cada suelo, Gráfica 6, donde el suelo 2 presento una tasa de mineralización de $3\text{mg } CO_2/\text{día}$ y el suelo 1 presento una tasa de $2\text{mg } CO_2/\text{día}$. Por último se trató de encontrar alguna diferencia estadística entre ambos suelos por medio de un análisis de varianza, ANOVA. Este análisis se realizó por medio del programa Excel con su herramienta data analysis y su función ANOVA para un factor. Los resultados más específicos se pueden observar en la Tabla 15. En este análisis se trabajó con un límite de confianza de 90% ($\alpha=0.1$). La prueba arrojó un valor de $p=0.098$, esto quiere decir que la hipótesis nula se rechaza, siendo para el caso de este pre experimento la hipótesis nula una similitud estadística entre los suelos, $p < 0.1$, la hipótesis nula se rechaza y sí existe una diferencia estadística entre ambos suelos, respaldando la suposición inicial de que el suelo con más contacto con hidrocarburos es el más apto para el experimento de degradabilidad.

En este caso la medición de degradación se vio limitada con la escala de la bureta con la que se tituló, debido a que su mínimo era 0.1ml. Esto limitó el cálculo de la neutralización por debajo de 0.1ml de HCl, por lo cual se optó en la siguiente etapa titular con HCl a 0.01M para no tener el mismo problema.

B. Degradabilidad de diesel y biodiesel por medio de la evolución del CO_2

Después de haber caracterizado y determinado el suelo óptimo para el experimento se trabajó con muestras de hidrocarburos, diesel, biodiesel y etanol en distintas proporciones de mezcla, nn la Tabla 3, se puede apreciar las distintas mezclas con las que se experimentó. Para

cada una se realizó el procedimiento de titulación de alícuotas de 10ml que ya se explicó con anterioridad, pero se utilizó 1.74 ± 0.05 ml para crear una solución (2 litros) 0.01M. Se trabajó con mezclas de B20, B100, diesel y una mezcla biodiesel-diesel-etanol (33:33:33). Para cada una se depositaron 200 gramos de tierra y 80 gramos del hidrocarburo. Estas cantidades siempre respetando la relación estipulada en la metodología 400 gramos de biodiesel por Kg de tierra. Estas muestras fueron tituladas con HCl 0.01M como se muestra en la Tabla 13, se graficaron los gramos de CO₂ con respecto a los días y se obtuvieron los siguientes resultados, para la degradación del biodiesel una tasa de mineralización de $3 \text{mg CO}_2/\text{día}$, para la muestra de diesel presentó una tasa de mineralización de $1 \text{mg CO}_2/\text{día}$. El diesel presentó una menor tasa de mineralización que las demás muestras, debido a que es una cadena más compleja. El diesel presenta cadenas largas de hidrocarburos de 10 a 20, compuesta por alcanos y alquenos que son más difíciles de asimilar por los microorganismos, también considerando que el diesel presenta mayor cantidad de aromáticos que son aun cadenas más difíciles de romper, por último es de considerar la falta de moléculas de oxígeno en las cadenas del diesel, por lo cual la degradación biológica se ve afectada significativamente.

En el caso del biodiesel se presentan diferentes resultados, la tasa de mineralización fue de $3 \text{mg CO}_2/\text{día}$, la misma que en el pre experimento. El biodiesel a diferencia del diesel presenta cadenas de ácidos grasos, estos son más fáciles para consumir para los microorganismos, por esa razón presenta mayor tasa de mineralización.

C. Degradabilidad B20 y mezcla Biodiesel-diesel-etanol por medio de la evolución del CO₂

Para la muestra de B20 (20 gramos de biodiesel, 80 gramos de diesel) se determinó una tasa de mineralización de $3 \text{mg CO}_2/\text{día}$ y para la muestra mezcla Biodiesel-Diesel-Etanol una tasa de mineralización de $3 \text{mg CO}_2/\text{día}$. La mezcla B20, con un 80% de diesel, presentó una tasa mayor a la del diesel 100%, para la mezcla $3 \text{mg CO}_2/\text{día}$ y $1 \text{mg CO}_2/\text{día}$ para el diesel. El biodiesel aporta ácidos grasos, de los cuales las bacterias se alimentan dada que ellas poseen enzimas lipasas que rompen los enlaces éster y liberan dichos ácidos grasos, agilizando el metabolismo para consumir hidrocarburos. Estos datos se respaldaron con los análisis de TPH mostrados posteriormente. En la mezcla biodiesel-diesel-etanol el biodiesel también aportó los

ácidos grasos y las enzimas como en la mezcla B20, pero esta energía para consumir se tuvo que dividir entre el consumo del diesel y las cadenas cortas de etanol.

Como ya se mencionó la adición de biodiesel en un 20%, aumentó la tasa de mineralización del diesel. Se hizo un análisis de varianza ANOVA, como en el caso del pre experimento, para determinar si el efecto del biodiesel en el diesel es significativo, los resultados se aprecian en la Tabla 23. Comparando los resultados de producción de CO₂, a un 90% de confianza, se determinó que si existe una diferencia significativa entre ambos resultados, $p = 0.09$.

D. Determinación de Degradabilidad por medio de TPHs del biodiesel y diesel

Para la determinación de la determinación de degradabilidad, se tuvo que contaminar el suelo con una cantidad de combustibles, se utilizaron en una relación de 400g de hidrocarburo por kilogramo de suelo. Esta cantidad de contaminación se basó en la cantidad de almacenamiento que poseen los tanques en la industria petrolera centroamericana, en RECOPE Costa Rica, con tanques de almacenamiento de 200 000 barriles, Planta Alva Salvador 350000 barriles y Perenco Guatemala, 450 000 barriles. Suponiendo un derrame de estos hidrocarburos en un área de 100m x 100m x 7m, se calculó una cantidad de 397.5 gramos de combustible (densidad 0.8) por 1 kilogramo de tierra.

Inicialmente cada muestra tenía una relación de 400gramos de hidrocarburo por 1 kilogramo de tierra, esto se traduce a 400 000mg de TPHs (hidrocarburos totales de petróleo) por 1 kilogramo de tierra. No existe un límite estándar dado por la EPA para la concentración de TPHs, se trabajó con un derrame en suelos que está muy por arriba de ciertos límites encontrados, según la guía de manejo de suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo de nueva Zelanda, módulo 4, (Tabla 28), el límite para suelos industriales es de 20 000 mg TPH/kg, de igual manera, la ley de concentración máxima para suelos del estado de California, Estados Unidos, el límite permitido a una profundidad de 4m, es un máximo de 150 000mgTPH/kg suelo (Tabla 29) y por último en el decreto 1215, de la República de Ecuador, reglamento ambiental para las operaciones hidrocarburíferas en el Ecuador, el límite permisivo para suelos industriales es de 4000 mg TPHs/kg suelo (Tabla 30). Por otro lado EPA reporta (Bioremediation” as a Removal Response Action at OPA Sites, 2002) derrames de petróleo donde se han presentado altos niveles de TPH, que asemejan a los de esta investigación, en 1997 el condado de Potter, Shinglehouse Pasadena presentó un caso donde el bosque fue contaminado por una vieja fábrica,

el suelo del bosque tenía un nivel de TPH de 891 500mg TPH/kg suelo y otro bosque cercano de 613 000 mg TPH/kg suelo. Tomando en cuenta todos los hechos ya mencionados el nivel de contaminación con él que se trabajó en esta investigación se encuentra entre los rangos de contaminación provocados por derrames y muy encima de los límites permisivos, por tales razones es apto para el desarrollo de una investigación de degradación.

La tierra con que se trabajó este apartado de la investigación se mantuvo en el mismo sistema mencionado en anteriormente (Ilustración 2) , en donde la tierra estuvo en contacto con el contaminante y en constante degradación , como se demostró con la evolución de CO₂ durante un 20 días. Al cumplir este tiempo, se extrajeron muestras de cada sistema, para extraer según el método de extracción por solvente los hidrocarburos restantes de la degradación. Cada muestra se pesó y se taro antes de la extracción (Tabla no 14). Se realizó la extracción como se mencionó en el apartado B, después de las 8 horas de extracción se pesaron las muestras, la diferencia de pesos entre la muestra inicial y la muestra final equivalen a los gramos de hidrocarburos extraídos. Tomando en cuenta los hidrocarburos iniciales se pudo calcular el porcentaje de remoción, la taza de degradación y por último los días en que la muestra se degradaría totalmente.

Para la muestra de biodiesel, la cantidad de TPHs inicial fue de 400 000mg TPH/kg suelo y la cantidad final fue de 61393 ±44998mg TPH/kg suelo, con un porcentaje de remoción del 84.64% y un tiempo de degradación total de 24±1.5 días. Estos datos respaldan los resultados de la evolución de CO₂ ya que el consumo de los microorganismos para esta muestra fue mayor lo cual indica una producción mayor del gas. Análogamente los días de remoción del biodiesel fueron los menores comparados a las demás muestras. Las razones son las mismas, la facilidad de asimilación de los ácidos grasos por las bacterias y la simplicidad de la cadena del biodiesel. En el caso del diesel los resultados se comportaron de igual manera que la evolución del CO₂, con los mismos TPHs iniciales que el biodiesel, el diesel después de los 20 días tuvo una concentración de 171 947 ±44998mg TPH/kg suelo, con un porcentaje de remoción de 57.01% y un tiempo de degradación total de 35 ±1.5 días. Como ya se discutió, el diesel presenta características moleculares que lo hacen más difícil de asimilar por ende mayor tiempo de degradación.

E. Determinación de degradabilidad por medio de TPHs del B20 y diesel-biodiesel-etanol

La muestra de B20 presento una mayor taza de mineralización que las del diesel y se demostró por una prueba estadística de ANOVA, estos resultados se vieron corroborados con el porcentaje de remoción y días de remoción de la muestra. Para el B20 inicialmente se tuvo 400 000mg/kg suelo, pero después de los 20 días se tuvo una concentración de $80\ 025 \pm 44998$ mg TPH/kg suelo y un porcentaje de remoción del 79.99% y un tiempo de remoción total de 25 ± 1.5 días. De la misma manera la mezcla del diesel con el biodiesel acelera la degradación del diesel, llevándolo a un porcentaje más alto de remoción y lo que es aún más importante a menor tiempo de degradación. La mezcla biodiesel-diesel-etanol, presentó un concentración final de $84\ 806 \pm 44998$ mg TPH/kg suelo y un tiempo de remoción total de 78.9%. El porcentaje de remoción para esta última muestra fue muy similar a la del B20, pero en este caso hay que tomar en cuenta que el etanol puede ser consumido por los microorganismos pero también al ser una mezcla muy volátil, al calentar la muestra en la extracción el etanol se pudo vaporizar facilitando su remoción.

F. Degradación por medio de bioestimulación

Se estimuló la tierra con nutrientes, provenientes de una solución de minerales esto para acelerar el proceso de degradación para las muestras, a cada muestra se le mezclo con la solución (2 gramos de K_2HPO_4 y 1 gramos de NaCl) sus nutrientes principales son el sodio y el potasio. La estimulación tuvo efectos en la taza de mineralización de todas las muestras, para el biodiesel se presentó una taza de $4\text{mg } CO_2/\text{día}$, el diesel $3\text{mg } CO_2/\text{día}$, el B20 $3\text{mg } CO_2/\text{día}$ y la mezcla de diesel-biodiesel-etanol una taza de $4\text{mg } CO_2/\text{día}$. La bioestimulación aumento la taza de mineralización de la mayoría de las muestras, esto debido a los nutrientes introducidos en las muestra fomentan el desarrollo y el metabolismo de los microorganismos presentes en el suelo. Para comparar si la bioestimulación contribuyo en la degradación del diesel, se trabajó una ANOVA nuevamente, comparando los datos de los gramos de CO_2 de las muestras de diesel con y sin estimulación, a un 90% de confianza, los resultados de la ANOVA se presentan en la Tabla 21, existe una mejora estadística entre la degradación del diesel sin estimulación y con estimulación ($p=0.099$), los estimulantes con los que se trabajan ayudan a los microorganismos a asimilar las cadenas largas y aromáticos que contiene el diesel, aportando le energía necesaria

para convertir tales cadenas en moléculas más simples para consumir. El hecho de estimular a los microorganismos crea un aumento en la tasa de mineralización, este efecto se ve reflejado en un mayor consumo de los hidrocarburos, es por esto que el biodiesel presentó un porcentaje de remoción mucho mayor a la muestra sin ser tratada, 95.5% de remoción ($17\,874 \pm 44998$ mg TPH/kg suelo) y un tiempo de remoción total de 21 días. Del mismo modo las muestras de B20 y de la mezcla diesel-biodiesel-etanol presentaron un aumento en su porcentaje de remoción 85.58% ($57\,692 \pm 44998$ mg TPH/kg suelo) y 83.66% (65341 ± 44998 mg TPH/kg suelo) respectivamente., al aumentar el porcentaje de remoción los días de degradación total se reducen a 23 y 24, para el B20 y la mezcla. La muestra que presentó un mayor aumento en el porcentaje de remoción y en el tiempo de degradación fue la muestra del diesel con un porcentaje de remoción del 73% ($108\,007 \pm 44998$ mg TPH/kg suelo) y 27 días, esto otra vez se explica con el aporte de los minerales en la estimulación, dando la energía necesaria para consumir el diesel.

G. Efecto del biodiesel en el diesel

Como ya se mencionó anteriormente se trabajó con una mezcla de B20, ósea una relación de 20 % de biodiesel y 80 % de diesel, esto para medir el efecto en la degradación del biodiesel en el diesel. En los métodos de medición, evolución de CO_2 y TPHs se encontró una diferencia en el comportamiento de la degradación del diesel y el B20. Para el caso del CO_2 se encontró una diferencia significativa ($p=0.09$) entre las cantidades de CO_2 producido por ambas muestras, esto debido a que el biodiesel fomenta el consumo de diesel de los microorganismos. De la misma forma el tiempo de degradación del diesel se estimó de 35 días mientras que para el B20 25 días, esto corrobora el hecho que la adicción de biodiesel al diesel fomenta su degradación más rápida. Todo esto se debe, a la cadena de carbonos que tiene el biodiesel, es un éster con ácidos grasos, ósea una cadena orgánica más fácil de asimilar comparada a la del diesel que contiene anillos aromáticos. Por otro lado las bacterias constan en su mayoría con enzimas degradadoras de ácidos grasos lo cual facilita aún más el consumo del biodiesel, estos ácidos grasos aportan energía extra para los microorganismos al descomponer el diesel. Es importante mencionar que para esta investigación se trabajó en mezcla los dos combustibles y no el biodiesel como un aditivo para la aceleración de la degradación, dado que si se hubiera agregado después, como aditivo los resultados variarían ya que se formarían dos capas de combustibles y serían consumidas en diferente ritmo.

X. CONCLUSIONES

- El biodiesel y el diesel presentaron una tasa de mineralización de $3 \text{ g } CO_2/\text{día}$ y de $1 \text{ g } CO_2/\text{día}$ respectivamente, de la misma forma presentaron un nivel de $61\,393 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$ y $171\,947 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$, por último presentaron un porcentaje de remoción del 84.65%. (una remoción total en 24 ± 1.5 día) para el biodiesel y 57.01%. (una remoción total en 35 ± 1.5 día) para el diesel.
- El B20 y la mezcla biodiesel-diesel-etanol presentaron una tasa de mineralización de $3 \text{ g } CO_2/\text{día}$, de la misma forma presentaron un nivel de $80\,025 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$ y $84\,806 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$ respectivamente, por último presentaron un porcentaje de remoción del 79.99%. (una remoción total en 25 ± 1.5 día) para el B20 y 78.80%. (una remoción total en 25 ± 1.5 día) para la mezcla.
- El biodiesel y el diesel con estimulación presentaron una tasa de mineralización de $4 \text{ g } CO_2/\text{día}$ y de $3 \text{ g } CO_2/\text{día}$ respectivamente, de la misma forma presentaron un nivel de $17\,874 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$ y $108\,007 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$, por último presentaron un porcentaje de remoción del 95.53%. (una remoción total en 21 ± 1.5 día) para el biodiesel y 73%. (una remoción total en 27 ± 1.5 día) para el diesel.
- El B20 y la mezcla biodiesel-diesel-etanol presentaron una tasa de mineralización de $3 \text{ g } CO_2/\text{día}$ y $4 \text{ g } CO_2/\text{día}$ respectivamente, de la misma forma presentaron un nivel de $57\,692 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$ y $65\,341 \pm 44998 \text{ mg TPH/Kg suelo}$, por último presentaron un porcentaje de remoción del 85.58%. (una remoción total en 23 ± 1.5 día) para el biodiesel y 83.66% (una remoción total en 24 ± 1.5 día) para el diesel.
- El suelo 1 obtuvo una tasa de $2 \text{ g } CO_2/\text{día}$ y el suelo 2 una tasa de $3 \text{ g } CO_2/\text{día}$.
- Si existe una diferencia significativa, 90%, entre el suelo 1 y 2 ($p=0.098$), siendo el suelo 2 el más óptimo para la degradación debido a la facilidad de asimilación de hidrocarburos de los microorganismos presentes.
- La degradación del diesel se ve afectada significativamente al ser mezclada con biodiesel, B20 ($p=0.0913$) porque este estimula a los microorganismos con sus cadenas de ácidos grasos.

- La estimulación afecto significativamente la degradación del diesel ($p=0.0996$) dado que aportan minerales que aceleran el metabolismo de los microorganismos.
- La mezcla B20 y B100 presentó mayor degradación que el diesel ya que el biodiesel es un hidrocarburo compuesto de ácidos grasos.

XI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio previo del suelo para determinar si es óptimo para la degradación.
- Realizar un estudio microbiano de los suelos
- Realizar un estudio de movilidad del hidrocarburo en el suelo y que tan significativo es en los resultados

Evolución de CO₂

- Se recomienda utilizar soluciones para titular a una concentración baja dado que lo gramos de CO₂ se encuentran en bajas concentraciones.
- Se recomienda siempre tener un control o un blanco para la producción de CO₂

Método TPHs

- Realizar un sistema de recuperación de solvente
- Si es posible realizar diferentes métodos aprobados para la medición de TPH y comparar resultados

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander Martin, *Biodregadation and bioremediation*, segunda edición New York, 1999.
- Asencio, G, Moreno, J., *Evaluación del uso de biodiesel en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos*, Instituto Antártico Chileno, Universidad de Magallanes, <http://www.eiq.cl/cchiq2009/resumenes/E/E5.pdf>, Chile, 2009
- Braibant Wayens Caroline, *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. Y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados*, Instituto tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología, Cartago , Costa Rica , 2004
- Cabarcas, Rogelinda , *Degradación de biodiesel y diversidad bacteriana en suelos arenosos en una zona industrial* ,Guayanilla Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez, 2005.
- “Bioremediation” as a Removal Response Action at OPA Sites EPA, 2002, <http://www.epa.gov/oem/docs/oil/fss/fss02/zenonepaper.pdf>
- Central de américa data, *Petroleras Centroamericana* <http://www.centralamericadata.com/es/search?q=Perenco+Guatemala+Inc>.
- Chinchilla Paul, *Factibilidad Técnica y económica del desarrollo de biodiesel a partir de aceites vegetales usados en una industria empacadoras de alimentos*, Trabajo de investigación para optar al grado de Licenciado, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, 2004
- Decreto 1215, Republica del Ecuador, *Reglamento ambiental para las operaciones hidrocarburiíferas en el Ecuador*.
- EPA, *Office of Transportation and Air Quality* EPA-420-F-10-009, <http://www.epa.gov/otaq/renewablefuels/420f10009.pdf> 2010
- EPA, *Acta de Aire Limpio, Sección 211B* , Estados Unidos, 2008 <http://epa.gov/oar/caa/title2.html#iic>

- EPA, *TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH) as Gasoline and Diesel*, SW-846 Method 8015B , 1996
- *Guidelines for Assessing and Managing Petroleum Hydrocarbon Contaminated Sites in New Zealand*, Module 4 - Tier 1 Soil Screening Criteria
- M. Camps, F. Marcos, *Los biocombustibles, Segunda edición*, Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona , 2008.
- Martínez Berg, *Diseño de una planta de biodiesel para la industrial de aceites Olmeca S.A, Trabajo de investigación para optar al grado de Licenciado*, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, 2008
- *Maximum Concentration Limits for soils containing nonhazardous concentrations of petroleum hydrocarbons, organic and inorganic compounds, metal and pesticides*, San Diego California, 1986.
- Miguel A. Leiva y Nuncio Nicolás Rodríguez Martínez, *El diesel, PEMEX, 2000*, México, <http://www.ref.pemex.com/octanaje/24DIESEL.htm>
- Perenco Guatemala, *Operaciones*, <http://www.perenco.com/operations/latin-america/guatemala.html>
- Randall von Wede, *Technical Handbook for Marine Biodiesel , Marine Biodiesel and Education Project for San Francisco Bay and Northern California*, Estados Unidos , 1999, <http://www.cytoculture.com/Biodiesel%20Handbook.htm#EMISSIONS%20REDUCTIONS%20WITH%20BIODIESEL>
- Solanas, Anna Maria , *La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en al biorremedación de suelos*, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 2009, España
- The National Biodiesel Board (NBB) , *Biodiesel*, <http://www.biodiesel.org/resources/faqs/>, 2010, Estados Unidos.
- Viñas Marc, *Biorremedación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica química y ecotoxicológica*, Barcelona, 2005

XIII. APÉNDICE

A. Datos originales

Tabla 12 Mililitros de HCl 0.04M para la titulación de KOH, determinación de suelo óptimo

Día	5	10	15	20
Muestra 11(±0.01ml)	2.00	1.80	1.60	1.20
Muestra 12(±0.01ml)	1.90	1.70	1.40	1.00
Muestra 13(±0.01ml)	1.70	1.60	1.20	1.10
Promedio(±0.01ml)	1.87	1.70	1.40	1.10
Control 1(±0.01ml)	2.30	2.30	2.30	2.30
Muestra 21(±0.01ml)	0.80	0.50	0.30	0.20
Muestra 22(±0.01ml)	0.60	0.70	0.40	0.20
Muestra23(±0.01ml)	0.60	0.30	0.30	0.10
Promedio(±0.01ml)	0.67	0.50	0.33	0.17
Control 2(±0.01ml)	2.2	2.2	2.2	2.2

Tabla 13 Mililitros de HCl 0.01M para la titulación de KOH, determinación de degradabilidad por medio de evolución de CO₂

Día	5	10	15	20
A(±0.01ml)	6.1	5.4	3.2	2.1
B(±0.01ml)	9.1	8.4	7.2	5.7
AB(±0.01ml)	5.2	4.6	2.7	1.1
ABC(±0.01ml)	5.1	4.1	2	1.3
A*(±0.01ml)	3.1	1.8	0.8	0.5
B*(±0.01ml)	5.5	4.9	3.2	2.2
AB*(±0.01ml)	5	3.7	1.8	1.1
ABC*(±0.01ml)	5.1	3.8	1.4	1

Tabla 14 Pesos para la extracción por solvente

	TARA ±0.0001g	Peso1 ±0.0001g	Peso2 ±0.0001g
A	32.2936	58.544	56.9324
B	31.1924	54.6048	50.5791
AB	33.7809	58.0332	56.0924
ABC	33.1269	56.473	54.4931
A*	53.7523	137.0206	135.5323
B*	55.1985	100.0551	91.2177
AB*	54.954	91.2953	89.1987
ABC*	55.3712	99.1786	96.3162

B. Cálculo de muestra

1. Determinación de KOH que no reaccionaron a partir de titulación con HCl

$$1ml \text{ HCL} * \left(\frac{1l}{1000ml}\right) \left(\frac{0.01molHCL}{1l}\right) \left(\frac{1molKOH}{1molHCL}\right) \left(\frac{1lt}{0.01molKOH}\right) \left(\frac{1000ml}{1lt}\right) \text{ Ec No 1}$$

Ejemplo para el cálculo de la medición para el día 5 , muestra A:

$$6.3ml \text{ HCL} * \left(\frac{1l}{1000ml}\right) \left(\frac{0.01molHCL}{1l}\right) \left(\frac{1molKOH}{1molHCL}\right) \left(\frac{1lt}{0.01molKOH}\right) \left(\frac{1000ml}{1lt}\right) = 6.3ml \text{ KOH}$$

2. Determinación de gramos de CO₂

$$1ml \text{ KOH} * \left(\frac{1l}{1000ml}\right) \left(\frac{0.01molKOH}{1l}\right) \left(\frac{1molH2CO3}{2mol \text{ KOH}}\right) \left(\frac{1mol \text{ CO}_2}{1molH2CO3}\right) \left(\frac{44g}{1molCO2}\right) \text{ Ec No 2}$$

Ejemplo para el cálculo de la medición para el día 5 , muestra A:

$$\begin{aligned} & 10ml - 6.3 \text{ ml KOH} \\ & * \left(\frac{1l}{1000ml}\right) \left(\frac{0.01molKOH}{1l}\right) \left(\frac{1molH2CO3}{2mol \text{ KOH}}\right) \left(\frac{1mol \text{ CO}_2}{1molH2CO3}\right) \left(\frac{44g}{1molCO2}\right) \\ & = 8.14 \times 10^{-4} \text{ gramos de CO}_2 \end{aligned}$$

3. Determinación de biodegradación a partir del método de THP

$$\text{gramos hidrocarburos iniciales en la muestra} = \frac{\text{Peso1} - \text{Tara}}{1000} * \frac{400g}{\text{kg suelo}} \text{ Ec No 3}$$

$$\text{gramos hidrocarburos finales en la muestra} = \text{Peso1} - \text{Peso2} \text{ Ec No 4}$$

$$\text{g hidrocarburos degradados} = \text{g hidrocarburos iniciales} - \text{g hidrocarburos finales} \text{ Ec No 5}$$

$$\text{TPH}_{\text{final}} = \frac{\text{g hidrocarburos degradados} * \frac{1000\text{mg}}{1\text{gramos}}}{\text{peso-tara} * \frac{1\text{kg}}{1000\text{g}}} = \text{TPH} \frac{\text{mg}}{\text{kgsuelo}} \text{ Ec No 6}$$

$$\% \text{ remoción} = \frac{\text{TPH}_{\text{final}}}{\text{TPH}_{\text{inicial}}} * 100 \text{ Ec No 7}$$

$$\text{días de remoción total} = \frac{80 \text{ g}}{\left(\frac{80\text{gramos hidrocarburo inicial} * \% \text{remocion}}{20 \text{ días}} \right)} \text{ Ec No 8}$$

Tomando como ejemplo la muestra de biodiesel:

gramos hidrocarburos iniciales en la muestra:

$$\begin{aligned} &= \frac{58.544 \pm 0.0001\text{g} - 32.2936 \pm 0.0001\text{g}}{1000\text{gramos/kg}} * \frac{400\text{g}}{\text{kg suelo}} \\ &= 10.5001\text{g hidrocarburo} \end{aligned}$$

gramoshidrocarburos finales en la muestra

$$= 58.544 \pm 0.0001\text{g} - 56.932 \pm 0.0001\text{g} = 1.6116\text{gramos}$$

$$\begin{aligned} \text{TPH}_{\text{final}} &= \frac{(10.5001\text{g hidrocarburo} - 1.6116\text{gramos}) * \frac{1000\text{mg}}{1\text{gramos}}}{58.544 \pm 0.0001\text{g} - 32.2936 \pm 0.0001\text{g} * \frac{1\text{kg}}{1000\text{g}}} \\ &= 61393 \text{ TPH} \frac{\text{mg}}{\text{kgsuelo}} \end{aligned}$$

$$\% \text{ remoción} = \frac{400\ 000 - 61393 \frac{\text{mg}}{\text{kgsuelo}}}{\frac{\text{mg}}{\text{kgsuelo}}} * 100 = 84.65\%$$

$$\begin{aligned} \text{días de remoción total} &= \frac{80 \text{ g}}{\left(\frac{80\text{gramos hidrocarburo inicial} * 0.8465\text{remocion}}{20 \text{ días}} \right)} \\ &= 24 \text{ días} \end{aligned}$$

4. Análisis de error

Cálculo de media

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i = \frac{a_1 + a_2 + \cdots + a_n}{n} \quad \text{Ec No 9}$$

Calculo de desviación estándar:

$$\sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \mu)^2}{N}} \quad \text{Ec No 10}$$

El cálculo de media y desviación estándar se calcularon por medio del programa EXCEL, Tabla 23

C. Datos calculados

Tabla 15 Mililitros de KOH 0.01M que reaccionaron con el ácido carbónico para determinación de suelo óptimo

Día	5	10	15	20
Muestra 11 (±0.01ml)	1.20	2.00	2.80	4.40
Muestra 12 (±0.01ml)	1.60	2.40	3.60	5.20
Muestra 13(±0.01ml)	2.40	2.80	4.40	4.80
Muestra 21(±0.01ml)	5.60	6.80	7.60	8.00
Muestra 22(±0.01ml)	6.40	6.00	7.20	8.00
Muestra 23(±0.01ml)	6.40	7.60	7.60	8.40
Suelo 1 prom(±0.01ml)	1.73	2.40	3.60	4.80
Suelo 2 prom(±0.01ml)	6.13	6.80	7.47	8.13
Control suelo 1(±0.01ml)	0.80	0.80	0.80	0.80
Control suelo 2(±0.01ml)	1.20	1.20	1.20	1.20

Tabla 16 Gramos de CO₂ proveniente de la degradación de los hidrocarburos, determinación de suelo óptimo

Día	5	10	15	20
Muestra 11 (±0.0001g)	2.64E-04	4.40E-04	6.16E-04	9.68E-04
Muestra 12 (±0.0001g)	3.52E-04	5.28E-04	7.92E-04	1.14E-03
Muestra 13(±0.0001g)	5.28E-04	6.16E-04	9.68E-04	1.06E-03
Muestra 21(±0.0001g)	1.23E-03	1.50E-03	1.67E-03	1.76E-03
Muestra 22(±0.0001g)	1.41E-03	1.32E-03	1.58E-03	1.76E-03
Muestra 23(±0.0001g)	1.41E-03	1.67E-03	1.67E-03	1.85E-03
Suelo 1 prom(±0.0001g)	3.81E-04	5.28E-04	7.92E-04	1.06E-03
Suelo 2 prom(±0.0001g)	1.35E-03	1.50E-03	1.64E-03	1.79E-03
Control suelo 1(±0.0001g)	1.76E-04	1.76E-04	1.76E-04	1.76E-04
Control suelo 2(±0.0001g)	2.64E-04	2.64E-04	2.64E-04	2.64E-04

Tabla 17 Gramos de CO2 acumulados por día, determinación de suelo óptimo.

Día	5	10	15	20
Muestra 11 (±0.0001g)	2.64E-04	7.04E-04	1.32E-03	2.29E-03
Muestra 12 (±0.0001g)	3.52E-04	8.80E-04	1.67E-03	2.82E-03
Muestra 13(±0.0001g)	5.28E-04	1.14E-03	2.11E-03	3.17E-03
Muestra 21(±0.0001g)	1.23E-03	2.73E-03	4.40E-03	6.16E-03
Muestra 22(±0.0001g)	1.41E-03	2.73E-03	4.31E-03	6.07E-03
Muestra 23(±0.0001g)	1.41E-03	3.08E-03	4.75E-03	6.60E-03
Suelo 1 prom(±0.0001g)	3.81E-04	9.10E-04	1.70E-03	2.76E-03
Suelo 2 prom(±0.0001g)	1.35E-03	2.85E-03	4.49E-03	6.28E-03
Control suelo 1(±0.0001g)	1.76E-04	3.52E-04	5.28E-04	7.04E-04
Control suelo 2(±0.0001g)	2.64E-04	5.28E-04	7.92E-04	1.06E-03

Tabla 18 Datos de análisis por varianza , ANOVA, determinación de suelo óptimo

SUMMARY							
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>			
Suelo 1 prom	4	0.00575064	0.00143766	1.06916E-06			
Suelo 2 prom	4	0.0149634	0.00374085	4.50647E-06			
ANOVA							
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
Between Groups	1.06094E-05	1	1.06094E-05	3.805619886	0.098949	5.987378	
Within Groups	1.67269E-05	6	2.78782E-06				
Total	2.73363E-05	7					

Tabla 19 Mililitros de HCl 0.01M para la titulación de KOH, determinación de degradabilidad por medio de evolución de CO₂

Día	5	10	15	20
A(±0.01ml)	3.9	4.6	6.8	7.9
B(±0.01ml)	0.9	1.6	2.8	4.3
AB(±0.01ml)	4.8	5.4	7.3	8.9
ABC(±0.01ml)	4.9	5.9	8	8.7
A*(±0.01ml)	6.9	8.2	9.2	9.5
B*(±0.01ml)	4.5	5.1	6.8	7.8
AB*(±0.01ml)	5	6.3	8.2	8.9
ABC*(±0.01ml)	4.9	6.2	8.6	9

Tabla 20 Gramos de CO₂ proveniente de la degradación de los hidrocarburos

Día	5	10	15	20
A(±0.0001g)	8.58E-04	1.01E-03	1.50E-03	1.74E-03
B(±0.0001g)	1.98E-04	3.52E-04	6.16E-04	9.46E-04
AB(±0.0001g)	1.06E-03	1.19E-03	1.61E-03	1.96E-03
ABC(±0.0001g)	1.08E-03	1.30E-03	1.76E-03	1.91E-03
A*(±0.0001g)	1.52E-03	1.80E-03	2.02E-03	2.09E-03
B*(±0.0001g)	9.90E-04	1.12E-03	1.50E-03	1.72E-03
AB*(±0.0001g)	1.10E-03	1.39E-03	1.80E-03	1.96E-03
ABC*(±0.0001g)	1.08E-03	1.36E-03	1.89E-03	1.98E-03

Tabla 21 Gramos de CO2 acumulados por día.

Día	5	10	15	20
A(±0.0001g)	8.58E-04	1.87E-03	3.37E-03	5.10E-03
B(±0.0001g)	1.98E-04	5.50E-04	1.17E-03	2.11E-03
AB(±0.0001g)	1.06E-03	2.24E-03	3.85E-03	5.81E-03
ABC(±0.0001g)	1.08E-03	2.38E-03	4.14E-03	6.05E-03
A*(±0.0001g)	1.52E-03	3.32E-03	5.35E-03	7.44E-03
B*(±0.0001g)	9.90E-04	2.11E-03	3.61E-03	5.32E-03
AB*(±0.0001g)	1.10E-03	2.49E-03	4.29E-03	6.25E-03
ABC*(±0.0001g)	1.08E-03	2.44E-03	4.33E-03	6.31E-03

Tabla 22 Porcentaje de remoción para suelos, prueba THP

Día	%
A	84.65%
B	57.01%
AB	79.99%
ABC	78.80%
A*	95.53%
B*	73.00%
AB*	85.58%
ABC*	83.66%

Tabla 23 Análisis de ANOVA, comparación degradación diesel –B20

SUMMARY						
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>		
B	4	0.004026	0.001007	7.03E-07		
AB	4	0.012958	0.00324	4.24E-06		
ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	9.97E-06	1	9.97E-06	4.032521	0.091393	3.77595
Within Groups	1.48E-05	6	2.47E-06			
Total	2.48E-05	7				

Tabla 24 Análisis de ANOVA, comparación degradación del diesel, con y sin bioestimulación

SUMMARY						
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>		
B	4	0.004026	0.001007	7.03E-07		
B*	4	0.012034	0.003009	3.53E-06		
ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	8.02E-06	1	8.02E-06	3.784519	0.099695	3.77595
Within Groups	1.27E-05	6	2.12E-06			
Total	2.07E-05	7				

Tabla 25 Hidrocarburos para el cálculo de TPH

	Hidrocarburos iniciales ±0.00004 gramos	Hidrocarburos Finales ±0.00004 gramos	Hidrocarburos degradados ±0.00004 gramos	TPH mg /kg suelo ±44998mg TPH/ kg suelo
A	10.50016	1.6116	8.8886	61393
B	9.36496	4.0257	5.3393	171947
AB	9.70092	1.9408	7.7601	80025
ABC	9.33844	1.9799	7.3585	84806
A*	33.30732	1.4883	31.8190	17874
B*	32.72884	8.8374	23.8914	197014
AB*	14.53652	2.0966	12.4399	57692
ABC*	17.52296	2.8624	14.6606	65341

Tabla 26 Hidrocarburos restantes y porcentajes remoción.

	mgTPH iniciales /kg suelo ±44998mg TPH/ kg suelo	mgTPH finales /kg suelo ±44998mg TPH/ kg suelo	% remoción	Gramos removidos /día	Días ±1.5 día
A	400000	61393	84.65%	3.3861	24
B	400000	171947	57.01%	2.2805	35
AB	400000	80025	79.99%	3.1997	25
ABC	400000	84806	78.80%	3.1519	25
A*	400000	17874	95.53%	3.8213	21
B*	400000	108007	73.00%	2.9199	27
AB*	400000	57692	85.58%	3.4231	23
ABC*	400000	65341	83.66%	3.3466	24

Tabla 27 Estadísticas descriptivas

<i>días</i>		<i>TPHs restantes</i>		<i>Iniciales</i>	
Mean	25.5872711	Mean	80885.76111	Mean	400000
Standard Error	1.50591928	Standard Error	15909.34821	Standard Error	0
Medían	24.4534415	Medían	72682.97928	Medían	400000
Mode	#N/A	Mode	#N/A	Mode	400000
Standard Deviation	4.25938295	Standard Deviation	44998.43201	Standard Deviation	0
Sample Variance	18.1423431	Sample Variance	2024858883	Sample Variance	0
Kurtosis	4.105063	Kurtosis	2.254703042	Kurtosis	
Skewness	1.8170759	Skewness	1.047921089	Skewness	
Range	14.1441396	Range	154073.7956	Range	0
Minimum	20.9354782	Minimum	17873.54852	Minimum	400000
Maximum	35.0796178	Maximum	171947.3441	Maximum	400000
Sum	204.698168	Sum	647086.0889	Sum	3200000
Count	8	Count	8	Count	8
Confidence Level(90.0%)	2.85308245	Confidence Level(90.0%)	30141.51073	Confidence Level(90.0%)	0

Tabla 28 Límites de TPHs para suelos comerciales para Nueva Zelanda

Soil Type/ Contaminant	Depth of contamination		
	Surface (<1m)	1m - 4m	> 4m
SAND C ₇ -C ₉ ⁽⁴⁾ C ₁₀ -C ₁₄ C ₁₅ -C ₃₈	120 ^(m) (1,500) ^(7,x) NA ⁽²⁾	120 ^(m) (1,900) ^(7,x) NA ⁽²⁾	(12,000) ^(7,8,v) (2,100) ^(7,x) NA ⁽²⁾
SANDY SILT C ₇ -C ₉ ⁽⁴⁾ C ₁₀ -C ₁₄ C ₁₅ -C ₃₈	(500) ^(7,m) (1,700) ^(7,x) NA ⁽²⁾	(500) ^(7,m) (2,200) ^(7,x) NA ⁽²⁾	(12,000) ^(7,v) (3,400) ^(7,x) NA ⁽²⁾
SILTY CLAY C ₇ -C ₉ ⁽⁴⁾ C ₁₀ -C ₁₄ C ₁₅ -C ₃₈	(8,800) ^(7,v) (1,900) ^(7,x) NA ⁽²⁾	(20,000) ^(7,m) (8,900) ^(7,x) NA ⁽²⁾	NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾
CLAY C ₇ -C ₉ ⁽⁴⁾ C ₁₀ -C ₁₄ C ₁₅ -C ₃₈	NA ⁽²⁾ (1,900) ^(7,x) NA ⁽²⁾	NA ⁽²⁾ (9,700) ^(7,x) NA ⁽²⁾	NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾
PUMICE C ₇ -C ₉ ⁽⁴⁾ C ₁₀ -C ₁₄ C ₁₅ -C ₃₈	(810) ^(7,m) (1,400) ^(7,x) NA ⁽²⁾	(810) ^(7,m) (3,600) ^(7,x) NA ⁽²⁾	(16,000) ^(7,v) (5,700) ^(7,x) NA ⁽²⁾
PEATS AND HIGHLY ORGANIC SOILS C ₇ -C ₉ ⁽⁴⁾ C ₁₀ -C ₁₄ C ₁₅ -C ₃₈	(6,700) ^(7,m) NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾	(6,700) ^(7,m) NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾	NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾ NA ⁽²⁾

*Según el manual de manejo de suelos contaminados con hidrocarburos, de nueva Zelanda , modulo 4,mg TPH/kg suelo.

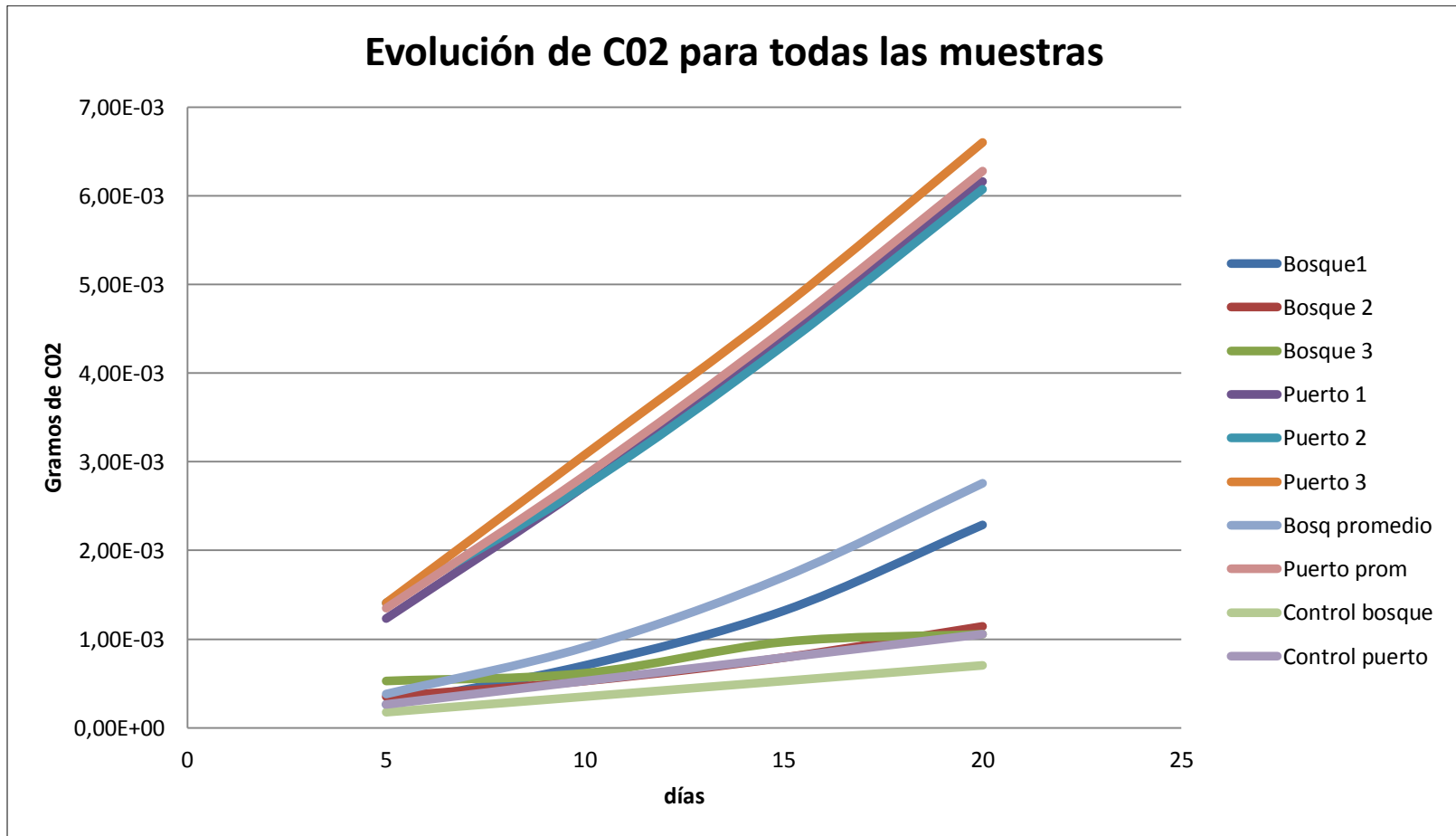
Tabla 29 Concentración máxima en suelo para el estado de California

Petroleum Hydrocarbon Contaminant	Maximum Concentration Limits	
Gasoline and lighter end hydrocarbons (C ₄ -C ₁₂)	1,000 ppm TPH	1,000 -5,000 ppm TPH w/RCI and 96 hour bioassay
Diesel fuel, Kerosene Oil, Jet Fuel, (C ₈ -C ₂₂) heavy end hydrocarbons	3,000 ppm TPH	3,000 -15000 ppm TPH w/RCI and 96 hour bioassay
Hydraulic Oil, Cutting and Grinding Oil, Virgin Motor Oil, Waste Oil (C ₈ -C ₄₀ heavy end hydrocarbons)	3000 ppm TRPH	3,000 -15000 ppm TPH w/RCI and 96 hour bioassay

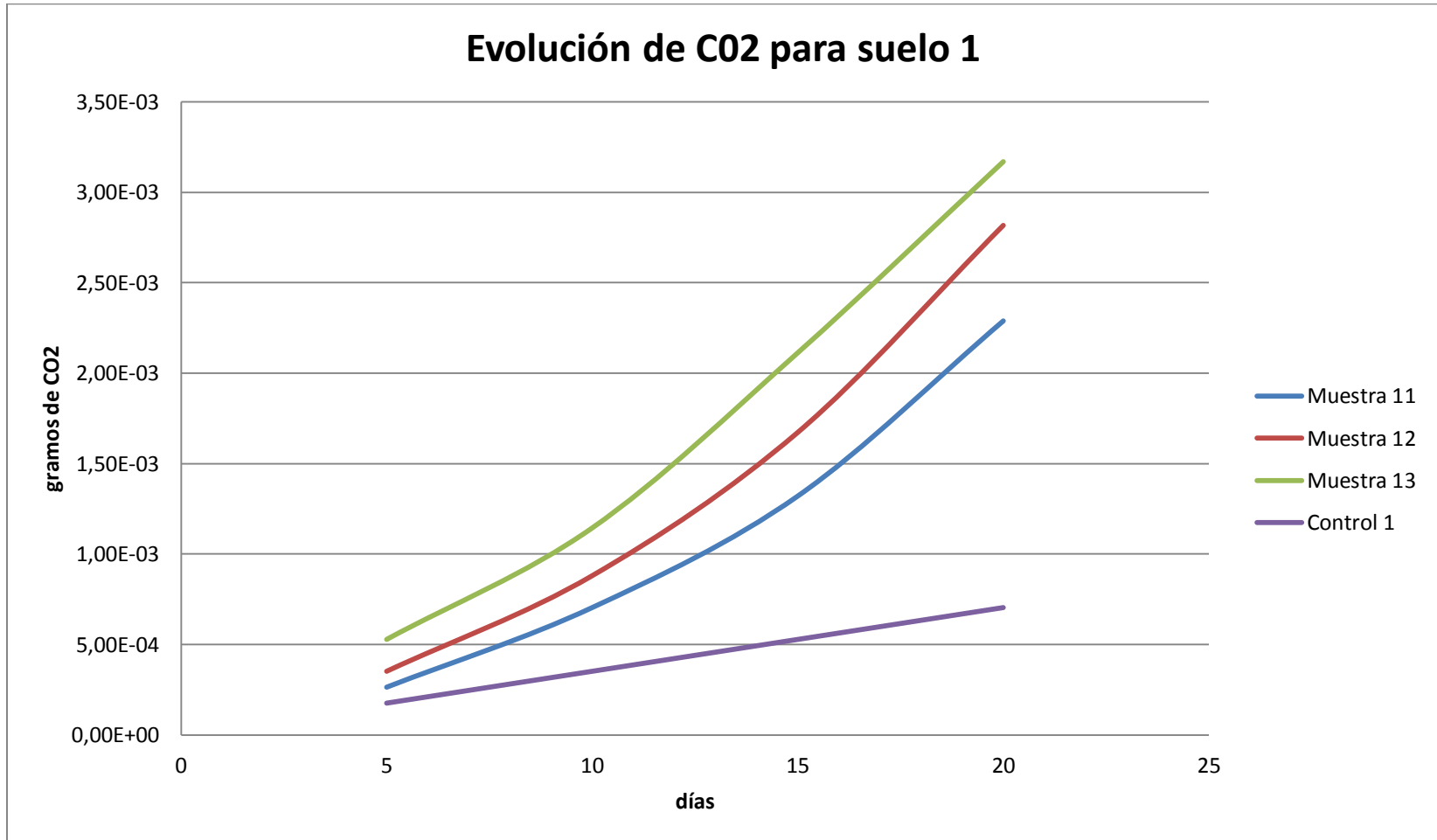
Tabla 30 Límites permisivos de TPHs para suelos, en el ecuador

Parámetro	Expresado en	Unidad ¹⁾	Uso agrícola ²⁾	Uso industrial ³⁾	Ecosistemas sensibles ⁴⁾
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	C	mg/kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/kg	<2	<10	<1
Niquel	Ni	mg/kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/kg	<100	<500	<80

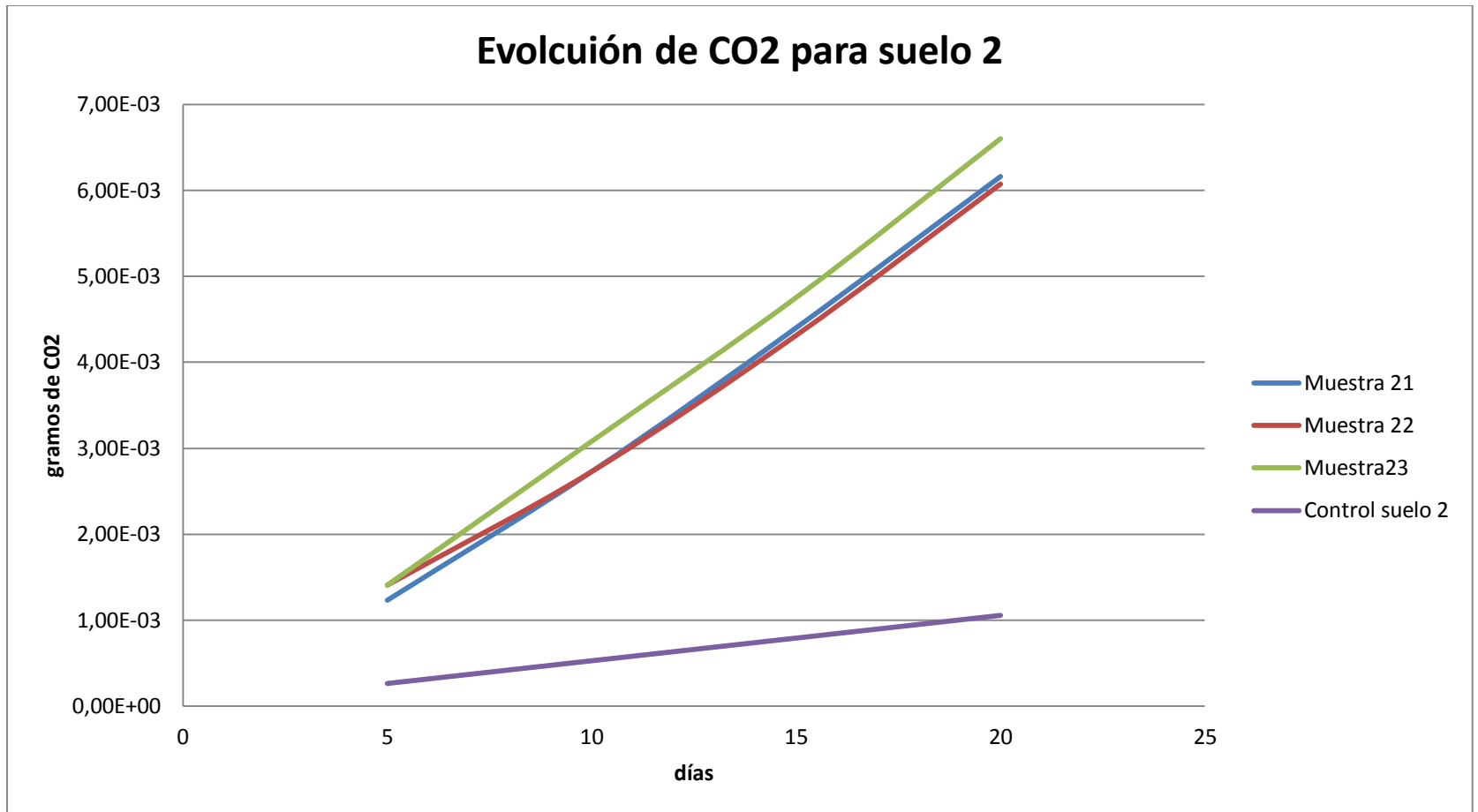
Gráfica 3 Evolución del CO2 para todas las muestra , suelo óptimo



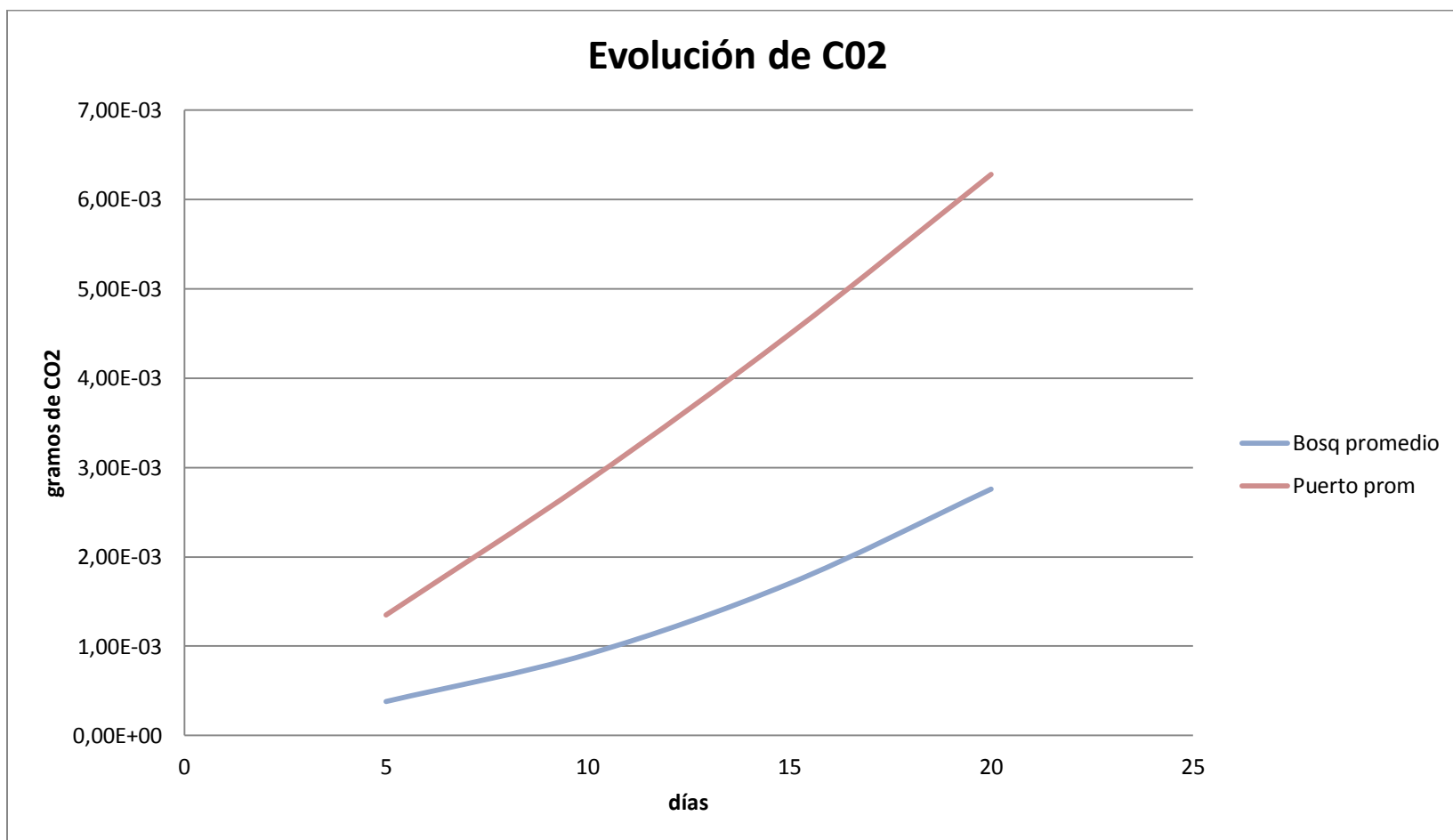
Gráfica 4 Evolución de CO2 para suelo 1



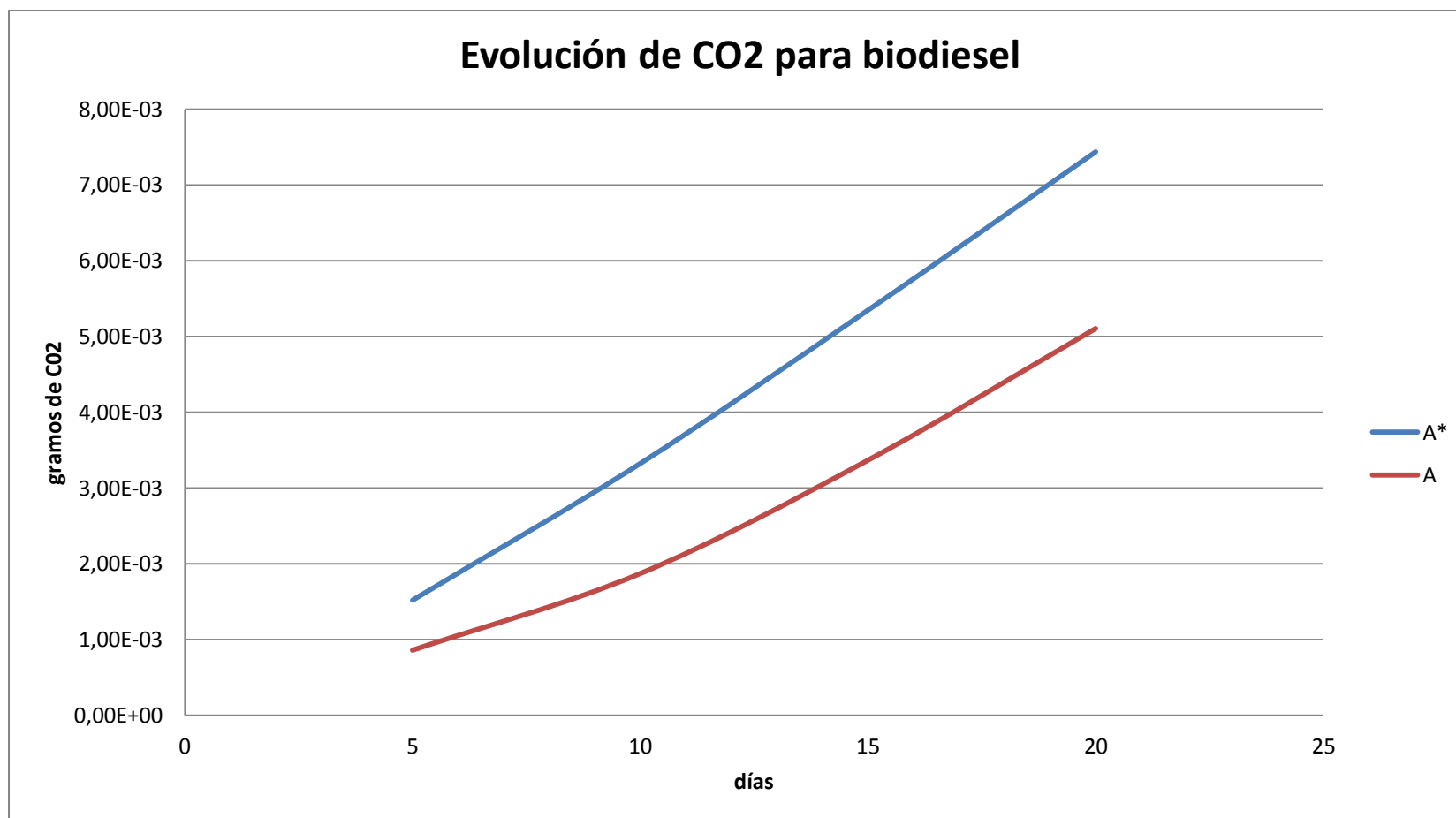
Gráfica 5 Evolución de CO2 para suelo 2



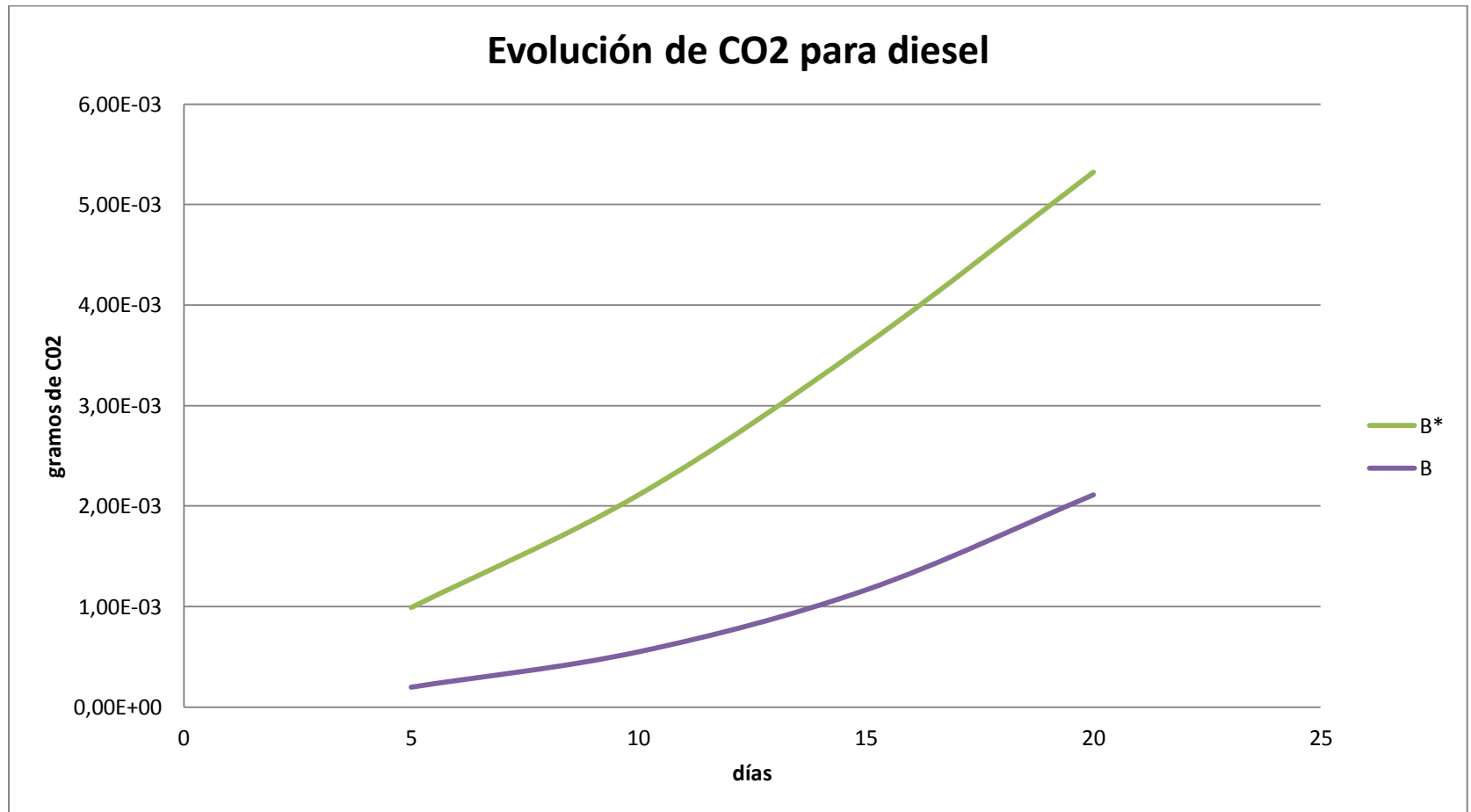
Gráfica 6 Evolución de CO2 promedio para ambos suelos



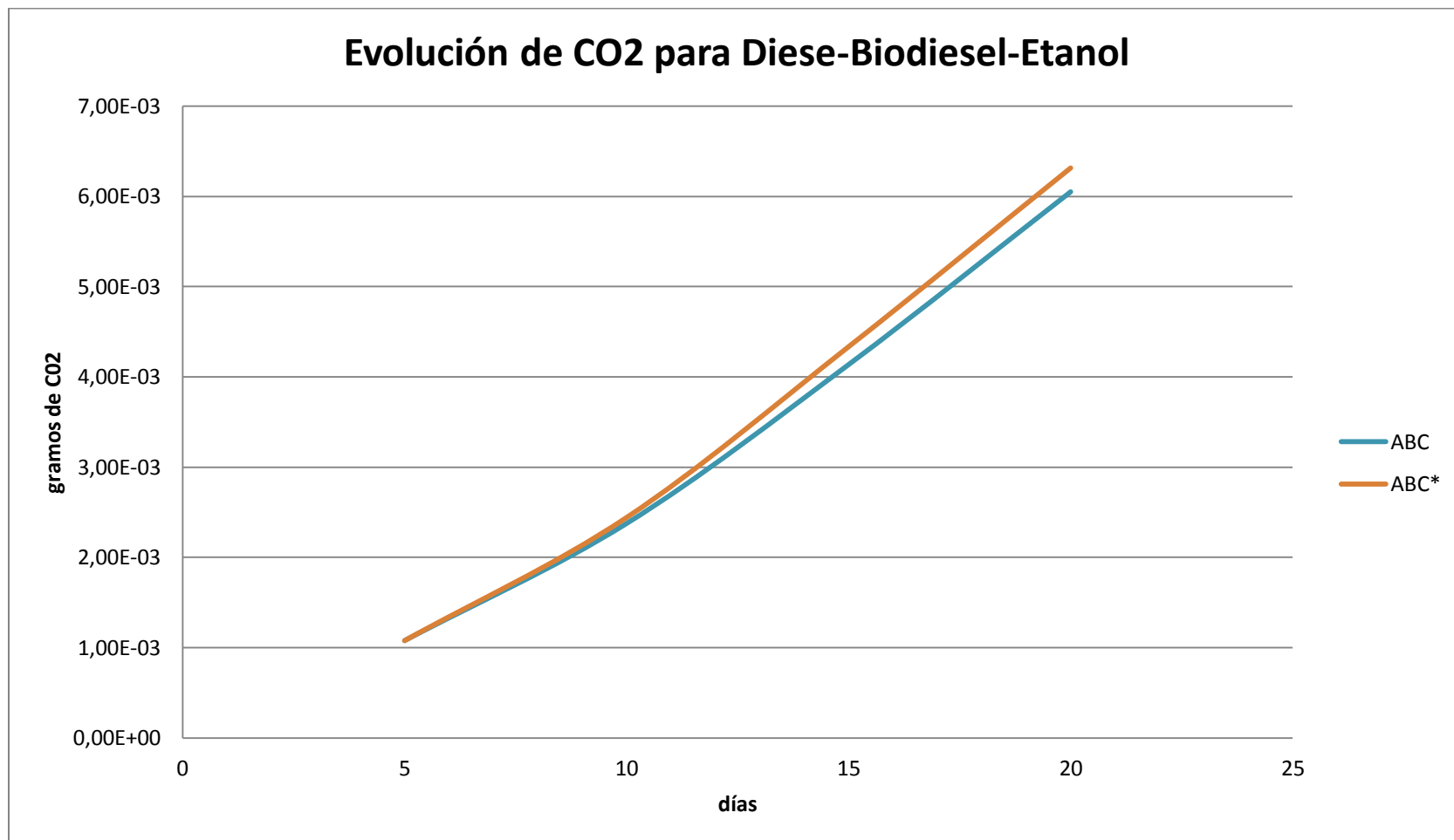
Gráfica 7 Evolución de CO2 para muestras de biodiesel



Gráfica 8 Evolución de CO2 para muestras de diesel



Gráfica 9 Evolución de CO2 para muestras de diesel-biodiesel-etanol



Gráfica 10 Evolución de CO2 para muestras de B20

