

Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”

Facultad de Ingeniería

Departamento de Química



Trabajo de Diploma en opción al título de
Ingeniero Químico

Título: Influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados a escala de banco.

Autor: Victor Manuel Serrano Suárez.

Tutores: MSc. Ing. Omar Gutiérrez Benítez.

MSc. Ing. David Javier Castro Rodríguez.

Ing. Enmanuel Casals Pérez.

Colaboradores: MSc. Ing. Dayana Rabassa Rabassa.

MSc. Lic. Orlando Manuel Viera Ribot.

Cienfuegos, 2020

Exergo

A decorative graphic element in the bottom right corner consisting of a thick horizontal line, a thin horizontal line above it, and a vertical line extending upwards from the end of the thin line.



“Cuando usted puede medir aquello de lo que habla, y lo expresa con un número, usted conoce algo sobre ello, pero cuando no puede medirlo, cuando no puede expresarlo con números, su conocimiento es pobre e insatisfactorio”

*William Thomson,
Lord Kelvin (1891)*

Dedicatoria

A decorative graphic element consisting of a horizontal line, a vertical line, and a small square symbol at the bottom right corner.

No podría faltar tal espacio para dedicar este trabajo a quienes han sido la razón de ser en mi empeño y esfuerzo, especialmente a mi abuelo José Manuel ya que me inculcó la vocación por la Ingeniería Química.

A mis padres y hermana, por su apoyo siempre incondicional, quienes durante toda mi vida han creído en mi como estudiante, hijo y hermano, orientándome por el camino del éxito y colmándome de amor, cariño y admiración.

A mi esposa, por haberme colmado de amor y cariño, respetado y apoyado en todos y cada uno de mis proyectos tanto académicos como de la vida.

Agradecimiento



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todo el claustro de profesores que contribuyó a mi formación, por su profesionalidad y por transmitirme sus experiencias y conocimientos en especial a Juan Felipe Medina Mendieta y Omar Gutiérrez Benítez.

Quiero agradecer a mi familia por todo el cariño del mundo y todas las fuerzas necesarias para vencer cada obstáculo.

Mi eterno agradecimiento a los tutores de esta tesis MSc. Ing. Omar Gutiérrez Benítez, MSc. Ing. David Javier Castro Rodríguez e Ing. Enmanuel Casals Pérez quienes me brindaron la oportunidad de aprender a su lado y cuyo apoyo ha sido fundamental para la consecución de este trabajo.

A la dirección del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC) por permitirme realizar tan importante obra y por la confianza depositada en mí.

A mis amigos y compañeros de aula.

A todos muchas gracias.

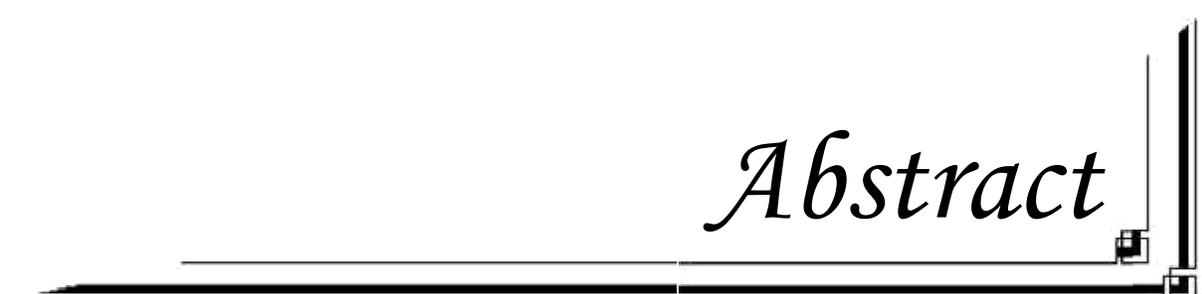
Resumen

A decorative graphic element at the bottom right of the page, consisting of a horizontal line, a vertical line, and a small square icon.

La contaminación con hidrocarburos es una problemática nacional. Es una prioridad la investigación y desarrollo de tecnologías de biorremediación. El Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos ejecuta un proyecto nacional para evaluar la eficacia de la ecotecnología de biopilas. El objetivo de la investigación fue evaluar la influencia de las variables de operación sobre la biorremediación de residuos petrolizados a escala de banco. Se diseñó y validó un procedimiento metodológico ordenado por etapas; utilizando el diseño de experimentos, balance de masa, diseño ingeniero y el análisis estadístico. Se empleó el diseño experimental de Box -Behnken con tres factores (concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo inicial, % de texturizante y % de humedad) y dos variables de respuesta (masa de Hidrocarburos Totales del Petróleo removida y concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo final). Se realizó una optimización simultánea para obtener una solución de compromiso, que maximizara la masa removida y asegurara que la concentración final del contaminante cumpliera con la norma de disposición final. La solución de compromiso se obtuvo para 39 278 mg/kg de concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo inicial, 6,45 % de texturizante y 25,95 % de humedad. Teniendo en cuenta resultados del diseño experimental, criterios ecotoxicológicos y de manejo de cada unidad experimental para el escalado de la ecotecnología se propuso que los valores de las variables de operación sean: 39 278 mg/kg de concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo inicial , 8 % de texturizante y 25 % de humedad.

Palabras claves: hidrocarburo, biorremediación, biopila, variables de operación , diseño Box-Behnken, optimización simultánea.

Abstract

A decorative graphic element in the bottom right corner consisting of a horizontal line, a vertical line, and two small squares at their intersection.

Hydrocarbon pollution is a national problem. Research and development of bioremediation technologies is a priority. The Center for Environmental Studies in Cienfuegos is executing a national project to evaluate the effectiveness of biopile ecotechnology. The objective of the research was to evaluate the influence of operational variables on the bioremediation of petroleum waste at the bench scale. A methodological procedure was designed and validated in stages, using design of experiments, mass balance, engineering design and statistical analysis. The Box-Behnken experimental design was used with three factors (concentration of Total Hydrocarbons of the initial Petroleum, % texturizer and % moisture) and two response variables (mass of Total Hydrocarbon of the Petroleum removed and concentration of Total Hydrocarbons of the final Petroleum). A simultaneous optimization was performed to obtain a compromise solution, which maximized the mass removed and ensured that the final concentration of the contaminant complied with the final disposal standard. The compromise solution was obtained for 39 278 mg/kg of concentration of Total Hydrocarbons of the initial Petroleum, 6,45 % texturizer and 25,95 % moisture. Taking into account the results of the design, ecotoxicological and management criteria of each experimental unit, for the scaling of the ecotechnology it was proposed that the values of the operation variables be 39 278 mg/kg of concentration of Total Hydrocarbons of the initial Petroleum, 8 % texturizer and 25 % moisture.

Keywords: hydrocarbon, bioremediation, biopile, operating variables, design Box-Behnken, simultaneous optimization.

Índice



Contenido:

Introducción.....	1
Capítulo 1: Marco Teórico Referencial.....	6
1.1 Manejo de residuos petrolizados.....	7
1.1.1 Problemática del manejo de residuos petrolizados.....	7
1.1.2 Efectos de la contaminación del medio ambiente con hidrocarburos.....	8
1.1.3 Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el ser humano.....	10
1.1.4 Opciones de manejo de residuos petrolizados	11
1.2 Biorremediación.....	12
1.2.1 Factores que condicionan la degradación de hidrocarburos.....	14
1.2.2 Fundamentos bioquímicos de la degradación de hidrocarburos.....	16
1.2.3 Microorganismos en la biorremediación.....	19
1.3 Tecnologías de biorremediación de residuos contaminados con hidrocarburos.....	20
1.3.1 Tecnologías en situ	23
1.3.2 Tecnologías ex situ	23
1.4 Ecotecnología de Biopilas.....	24
1.4.1 Factores que intervienen en la ecotecnología de biopilas.....	25
1.4.2 Ventajas y desventajas de la ecotecnología de biopilas	28
1.5 Diseño ingeniero de las biopilas.....	29
1.6 Diseño de experimento.....	31
1.6.1 Metodología de Superficie y Respuesta.....	33
1.6.1.1 Diseño de Box -Behnken.....	36
1.6.1.2 Aplicaciones de la MSR en la biorremediación.....	37
1.7 Conclusiones parciales.....	37
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	39

2.1 Caracterización de los materiales (suelo, residuo petrolizado y texturizantes).	40
2.1.1 Elección, acopio y caracterización del suelo.....	40
2.1.2 Elección, acopio y caracterización del residuo petrolizado.	40
2.1.3 Elección, acopio y caracterización de los materiales texturizantes.	41
2.2 Diseño de experimentos.....	41
2.3 Diseño ingeniero de las unidades experimentales.	45
2.4 Montaje de las unidades experimentales.....	47
2.4.1 Estabilización del sistema suelo -residuo petrolizado	47
2.4.2 Conformado de las unidades experimentales.....	47
2.5 Monitoreo de las unidades experimentales.....	50
2.6 Análisis estadísticos de los datos de temperatura y humedad de las unidades experimentales.	52
2.7 Evaluación de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).	53
2.7.1 Análisis de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).	53
2.7.2 Análisis e interpretación de los resultados del diseño experimental.....	54
2.8 Evaluación ecotoxicológica.	57
2.8.1 Patrón animal empleando <i>Eisenia foetida</i>	58
2.8.2 Patrón vegetal empleando <i>Lactuca sativa</i>	60
2.9 Manejo de las unidades experimentales	62
2.10 Selección de los valores de las variables de operación a utilizar en el escalado de la ecotecnología de biopila.....	62
2.11 Conclusiones parciales	62
Capítulo 3: Análisis y discusión de los resultados.....	64
3.1 Caracterización de los materiales (suelo, residuo petrolizado y texturizante).	64
3.1.1 Elección, acopio y caracterización del suelo.....	64
3.1.2 Elección, acopio y caracterización del residuo petrolizado.	65

3.1.3 Elección, acopio y caracterización de los materiales texturizantes.	66
3.2 Diseño de experimentos	67
3.3 Diseño ingeniero de las unidades experimentales.	68
3.4 Montaje de las unidades experimentales.	69
3.5 Monitoreo de las unidades experimentales.	71
3.6 Análisis estadístico de los datos temperatura y humedad de las unidades experimentales.	72
3.7 Evaluación de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).	80
3.7.1 Análisis de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).	80
3.7.2 Análisis e interpretación de los resultados del diseño experimental.	82
3.8 Evaluación ecotoxicológica.	99
3.8.1 Patrón animal empleando <i>Eisenia foetida</i>	99
3.8.2 Patrón vegetal empleando <i>Lactuca sativa</i>	100
3.9 Manejo de las unidades experimentales	101
3.10 Selección de los valores de las variables de operación a utilizar en el escalado de la ecotecnología de biopila.	103
3.11 Conclusiones parciales	104
Conclusiones Generales	106
Recomendaciones.	107
Bibliografía	108
Anexos:	

Introducción



Introducción.

La Asamblea de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente estableció que es una prioridad la reducción de la contaminación del agua, la tierra y el aire; así como la gestión segura de desechos y de químicos (UN, 2017). La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible reconoce metas que requieren de la reducción de la contaminación (CEPAL, 2016).

En Cuba existe aún un grado significativo de contaminación ambiental, con un sensible impacto en el estado de los diferentes componentes del medio ambiente y la calidad de vida de las personas. En este contexto es un objetivo estratégico disminuir la contaminación como vía para mejorar la calidad ambiental del aire, los suelos y el agua (CITMA, 2015).

La Conceptualización del Modelo Económico y Social Cubano de Desarrollo y las Bases del Plan Nacional de Desarrollo Económico y Social de Cuba hasta 2030 (PCC, 2017) han establecido a los recursos naturales y medio ambiente como un eje estratégico. Se prevé, entre otros, el objetivo de prevenir y controlar la contaminación ambiental y desarrollar una gestión integral de las fuentes de contaminación, orientada a la mejora paulatina de la calidad ambiental. Del mismo modo, en los Lineamientos de la Política Económica y Social del Partido y la Revolución (PCC, 2017) se plantean metas en esta prioridad.

La Política Ambiental Cubana (CITMA, 2015) establece instrumentos de regulación directa, que consisten en leyes, decretos leyes, decretos y resoluciones que prescriben objetivos de calidad ambiental, así como de manejo y conservación de los recursos naturales. Asimismo, existen un conjunto de normas técnicas relativas a requisitos de vertimientos, la contaminación ambiental, y al manejo de hidrocarburos y desechos oleosos; y están vigentes Normas Cubanas que establecen requerimientos con relación al almacenamiento de hidrocarburos, y la protección del medio ambiente.

La Directiva 1 del Presidente del Consejo de Defensa Nacional de Cuba para la reducción de desastres (CDN, 2018) reconoce a los derrames de hidrocarburos como uno de los principales peligros de origen tecnológico en el país. Se establece implementar las acciones para la prevención de desastres, incluidas acciones de respuesta y recuperación, a todos los niveles de los organismos y órganos estatales.

La contaminación con hidrocarburos puede provocar una amplia variedad de impactos en el medio ambiente y en la salud (Bosco, Casale, Mazzarino, et al., 2019; Cocarta, Stoian, & 1

Karademir, 2017).

En este contexto, el manejo de residuos petrolizados constituye una problemática de alcance nacional (CITMA, 2015). Se ha identificado la generación de residuos petrolizados procedentes de los sistemas de tratamiento de residuales de refinerías, termoeléctricas, grupos electrógenos, talleres mecánicos y plantas de fregado, entre otros, sin sistemas de tratamiento adecuados (Jiménez, 2018).

En la remediación de residuos y suelos contaminados con hidrocarburos son utilizados procesos químicos, físicos y biológicos (Riser-Robert, 2019; Volke & Velasco, 2002). El uso de métodos de biorremediación es relativamente reciente y presentan ventajas respecto a los demás procesos (De Oliveira et al., 2018; Kumar, Bisht, Joshi, & Dhewa, 2011; Thapa, Kumar, & Ghimire, 2012; Tyagi, Da Fonseca, & De Carvalho, 2011; Varjani, 2017; Yuniati, 2018).

El concepto de biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover, biodegradar o biotransformar compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos. Estos procesos biológicos involucran enzimas como catalizadores que modifican moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura y en sus propiedades toxicológicas. Se altera la estructura molecular y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. El término biotransformación se refiere a la transformación de un compuesto orgánico en otro similar, mientras que en la mineralización se produce la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua y residuos inorgánicos inertes (Ercoli, 2008; Eweis, Ergas, Chang, & Schroeder, 1998; Van Deuren, Wang, & Ledbetter, 1997; Velasco & Volke, 2003).

Los métodos de la biorremediación se clasifican en: bioestimulación y bioaumentación. La bioestimulación consiste en la adición de fuentes de nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), para potenciar la actividad microbiana existente. La bioaumentación es aplicada cuando no existe la cantidad de bacterias endógenas necesarias para aplicar el proceso degradativo y consiste en la inoculación de cepas de bacterias, hongos y microorganismos al proceso, aisladas del medio afectado (ONN, 2017).

Es una prioridad nacional la investigación, desarrollo e innovación en tecnologías dirigidas a

la biorremediación de hidrocarburos. La Agencia de Medio Ambiente (AMA) del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) gestiona el Programa de Ciencia, Tecnología e Innovación de Interés Nacional "Uso sostenible de los componentes de la Diversidad Biológica en Cuba" que concibe este alcance (AMA, 2016).

En el marco de este programa el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC), de conjunto con el Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR) y el Instituto Investigaciones de Suelos (IIS) ejecutan el proyecto nacional "Evaluación a escala piloto de la ecotecnología de biopilas para la biorremediación de residuos petrolizados utilizando texturizantes locales".

Jiménez (2018) en un estudio previo de la planificación del proceso de investigación - desarrollo de una ecotecnología para la biorremediación de residuos petrolizados, seleccionó la ecotecnología de biopilas como la más pertinente. Demostró que la ecotecnología de biopilas es una tecnología alternativa, novedosa, eficaz, generalizable, menos costosa que otras alternativas con efectividad demostrada, utilizadas con anterioridad en Cuba.

La ecotecnología de biopilas es una tecnología ex situ, que es pertinente para la biorremediación de residuos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos (EPA, 2017; Ercoli, 2008; Volke & Velasco, 2002). Es una forma de composteo en el cual se forman montículos o pilas de suelo, residuos petrolizados y texturizantes, acondicionantes y/o mejoradores. Estos materiales son residuos orgánicos, de origen agrícola o industrial, que aportan nutrientes y flora microbiana, mejoran la porosidad y la aireación, y mantienen los niveles de humedad. La bioestimulación de la actividad microbiana mediante la adición de nutrientes, la aireación y la humedad, favorece la biodegradación y mineralización de los hidrocarburos (Prakash et al., 2015; Snelgrove, 2010; Velasco & Volke, 2003).

González (2019) realizó la evaluación de la eficacia de la ecotecnología de biopilas para la biorremediación de residuos petrolizados procedentes de los separadores de la planta de tratamiento de residuales de la Refinería de Petróleo de Cienfuegos a escala de banco utilizando seis tipos de texturizantes: bagazo, cachaza, serrín, pulpa de café, estiércol vacuno, y residuos de *Thalassia testudinum*. Concluyó que el estiércol vacuno y el bagazo de caña resultaron ser los candidatos más idóneos, entre los seis texturizantes evaluados. El primero debido a su mayor porcentaje de remoción de hidrocarburos y el segundo por su capacidad de retención de humedad y comportamiento microbiológico. Propuso utilizar un texturizante

combinado con un 75 % de estiércol vacuno y un 25 % para el bagazo de caña, sustentado en el principio de Pareto y en experimentos previos sobre el manejo de las biopilas.

Las investigaciones anteriores han demostrado que la ecotecnología de biopilas es una alternativa de tratamiento de residuos petrolizados eficaz, pero se desconoce la influencia de las variables de operación, sobre la eficacia de la biorremediación, lo que constituye la **situación problemática** de la investigación.

De lo anterior se deriva la siguiente **pregunta de investigación**: ¿Cómo influyen las variables de operación de la ecotecnología de biopilas, sobre la biorremediación de residuos petrolizados, a escala de banco?

Por tanto, el **objeto de estudio** al cual contribuye esta investigación es la biorremediación de residuos petrolizados y su **campo de acción** es la ecotecnología de biopilas.

De lo anterior se generó la **hipótesis de la investigación** :

“Si se conoce la influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas, se podrá adoptar en su escalado para mejorar la eficacia de la biorremediación de residuos petrolizados a escala piloto”

Objetivo general:

Evaluar la influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados a escala de banco.

Objetivos específicos:

1. Analizar los fundamentos teóricos, avances y tendencias de la investigación y desarrollo de la ecotecnología de biopila.
2. Diseñar el procedimiento metodológico para la evaluación de la influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados a escala de banco.
3. Evaluar la biorremediación de residuos petrolizados mediante la ecotecnología de biopilas a escala de banco en función de las variables de operación estudiadas.
4. Seleccionar el valor de las variables de operación para el escalado de la ecotecnología a escala piloto.

El Trabajo de Diploma se estructura en forma de tres capítulos de la siguiente manera:

Capítulo I: En este capítulo se desarrolló el Marco Teórico Referencial, donde se analizaron los fundamentos teóricos que sustentan la ecotecnología de biopilas, que comprende: el manejo de residuos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos, los fundamentos bioquímicos y cinéticos de la degradación de dichos compuestos y los diferentes microorganismos que la propician. Asimismo, se discutió sobre las principales tecnologías de biorremediación haciendo especial énfasis en la ecotecnología de biopilas, en particular sobre los parámetros físicos, químicos y biológicos, y la ingeniería y criterios de diseño de esta ecotecnología. También se profundizó en el diseño de experimento, técnica estadística mediante la cual se puede mejorar la eficacia de la ecotecnología en cuestión.

Capítulo II: En este capítulo se desarrolló el segundo objetivo específico de la investigación. Se construyó un procedimiento metodológico para la evaluación de la influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados a escala de banco, a partir de los fundamentos teóricos que sustentan la ecotecnología. Incluye un diagrama heurístico con sus protocolos, en los que se destacan el diseño experimental e ingeniero; y las evaluaciones, de la degradación de hidrocarburo, ecotoxicológicas y del manejo de las unidades experimentales (biopilas).

Capítulo III: En el capítulo se desarrolló el tercer y cuarto objetivo específico de la investigación. Se implementó el procedimiento metodológico diseñado para la evaluación de la influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados a escala de banco. Se expusieron los resultados y discusión de la evaluación de la biorremediación de residuos petrolizados mediante la ecotecnología de biopilas y de la selección de los valores de las variables de operación para ser utilizadas en escalado de la ecotecnología.

Finalmente se muestran las **Conclusiones Generales** y las **Recomendaciones** de la investigación .

En la sección de **Anexos** se provee información de interés relacionada con los temas abordados en los capítulos precedentes y que apoyan el entendimiento de la investigación.

Capítulo 1

Capítulo 1: Marco Teórico Referencial.

En este capítulo se elaboró el Marco Teórico Referencial, dando cumplimiento al primer objetivo específico de la investigación. Se analizaron los fundamentos teóricos avances y tendencias de la investigación y desarrollo de la ecotecnología de biopila, que comprende aspectos relacionados con la problemática del manejo de residuos petrolizados, los efectos de la contaminación con hidrocarburo sobre el medio ambiente y la salud humana, y las opciones de manejo. Se profundizó sobre la biorremediación de hidrocarburos, los factores que la condicionan, los fundamentos bioquímicos y los microorganismos que la propician. Asimismo, se discutió sobre las principales tecnologías de biorremediación, en particular la ecotecnología de biopilas y los criterios ingenieriles de diseño. Por último, se enfatizó sobre la utilización del diseño de experimentos en la investigación científica, las etapas de la planeación, análisis e interpretación de un experimento; y también sobre la aplicación de la Metodología de Superficie y Respuesta para la optimización de procesos y los principales tipos de diseño. En la figura 1 se muestra el hilo conductor utilizado.

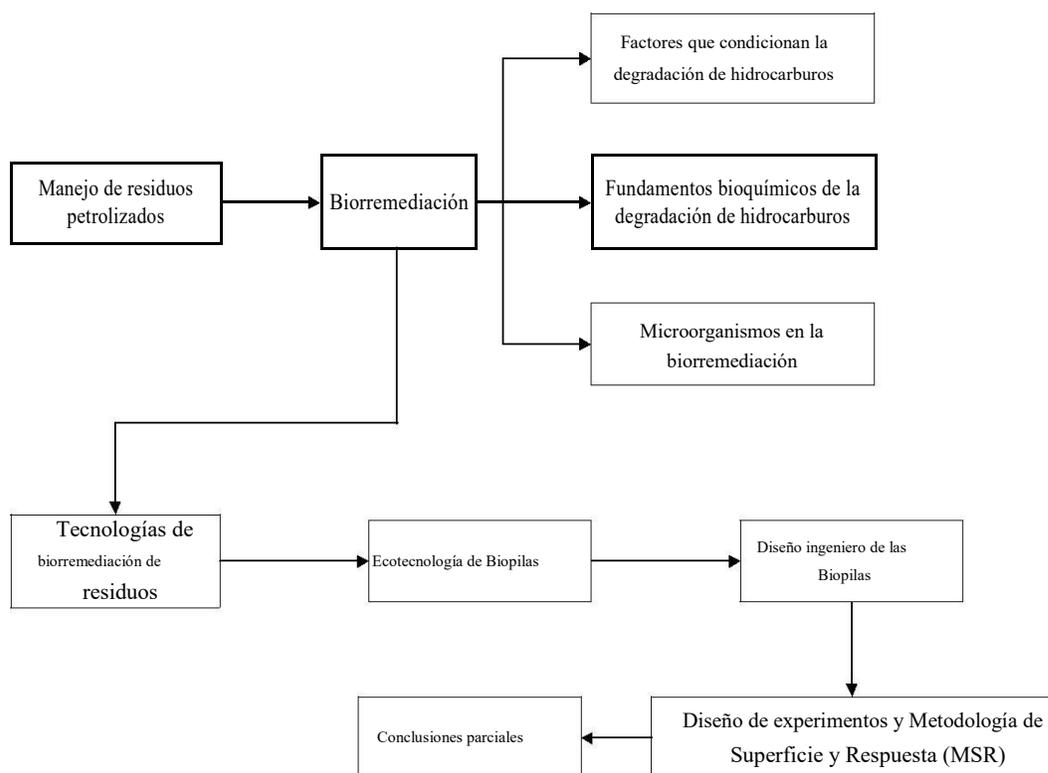


Figura 1: Hilo conductor del Marco Teórico Referencial. Fuente: Elaboración propia.

1.1 Manejo de residuos petrolizados.

1.1.1 Problemática del manejo de residuos petrolizados.

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por átomos de carbono e hidrógeno. La estructura molecular consiste en una cadena de átomos de carbono que pueden ser ramificados o lineales, y abiertas o cerradas. Los hidrocarburos se pueden clasificar en dos tipos, alifáticos y aromáticos. Los alifáticos, a su vez, se pueden clasificar en saturados (alcanos) o no saturados (alquenos y alquinos), según los tipos de enlace que unen entre sí los átomos de carbono (Moliterni, 2016).

El petróleo es un combustible natural compuesto de varios tipos de hidrocarburos, es decir de moléculas que contienen básicamente, carbono e hidrógeno. Estas moléculas pueden estar formadas de cadenas de átomos de carbono largas o cortas y que pueden adoptar diferentes estructuras. Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías de compuestos, alifáticos, aromáticos, resinas y asfaltenos (Varjani, 2017). Sus estructuras químicas se pueden observar en el anexo 1.

Las actividades de extracción, refinación y distribución de hidrocarburos generan peligros de derrames a nivel mundial (IPIECA, 2004). Según ITOPF (2011a), el componente más costoso y que requiere más tiempo de una respuesta a un derrame de hidrocarburos suele ser el tratamiento o la eliminación de los residuos recolectados, la cantidad de residuos generados a veces pueden ser decenas de veces mayor que la cantidad de inicial del derrame de hidrocarburo, esto depende de numerosos factores, como por ejemplo el tipo y volumen de hidrocarburos derramados, de la medida en que estos se esparcen y afectan la costa, el suelo, el mar, entre otros medios y, lo más importante de los métodos empleados para recolectar los hidrocarburos derramados.

En Cuba se reconoce a los derrames de hidrocarburos como uno de los principales peligros de origen tecnológico en el país (CDN, 2018). Sin embargo, los derrames accidentales no son la única fuente de peligro de contaminación con hidrocarburos en el país. También los son la generación de residuos petrolizados procedentes de los sistemas de tratamiento de residuales de refinerías, termoeléctricas, grupos electrógenos, talleres mecánicos y plantas de fregado, entre otros, sin sistemas de tratamiento adecuados (Jiménez, 2018).

Investigaciones y servicios ambientales realizadas por Bermúdez, Castro, Gutiérrez y Poma (2014) Gutiérrez, Castro, Poma, Rabassa y Viera (2016); Gutiérrez, Castro, Rabassa, Viera y Casals (2017, 2018); Castro, Leyva, Santana, González y Rodríguez (2013) y Rabassa (2018) dan fe de ello. En el anexo 2 se muestra la ubicación de entidades en la región central del país que se han identificado con antecedentes de contaminación con hidrocarburos debido al manejo inadecuado de residuos petrolizados.

En este contexto, el manejo de residuos petrolizados constituye una problemática de alcance nacional (CITMA, 2015); ya que puede provocar una amplia variedad de impactos en el medio ambiente y en la salud (Cocarta et al., 2017).

1.1.2 Efectos de la contaminación del medio ambiente con hidrocarburos.

De acuerdo a Ccolque y Vargas (2017) cualquier tipo de hidrocarburos, ya sea, crudo o refinado, daña los ecosistemas produciendo la muerte de los organismos por asfixia, el aumento de infecciones en las especies, especialmente aves, por absorción de ciertas cantidades subletales de petróleo. También produce efectos negativos sobre la reproducción y propagación de la fauna y flora marina, así como la destrucción de las fuentes alimenticias de las especies superiores y la incorporación de carcinógenos en la cadena alimentaria.

Los hidrocarburos pueden afectar al medio ambiente a través de uno o más de los siguientes mecanismos (ITOPF, 2011b):

- Asfixia con efectos en las funciones fisiológicas.
- Toxicidad química que genere efectos letales y subletales o provoque el deterioro de funciones celulares.
- Cambios ecológicos, principalmente la pérdida de organismos clave de una comunidad y la conquista de hábitats por parte de especies oportunistas.
- Efectos indirectos como por ejemplo la pérdida del hábitat o refugio y la eliminación resultante de especies con importancia ecológica.

El medio marino abarca una amplia variedad de ecosistemas extremadamente complejos, y la existencia de considerables fluctuaciones tanto en abundancia como en diversidad son una característica de su funcionamiento normal (ITOPF, 2011b; Núñez, Lorenzo, Ortiz, & Oramas, 2010).

El medio marino tiene una gran capacidad de recuperación natural frente a perturbaciones intensas provocadas por fenómenos naturales, así como por derrames de hidrocarburos. Los mecanismos clave del daño medioambiental derivado de derrames de hidrocarburos son la asfixia y la toxicidad, aunque la intensidad del daño depende en gran medida del tipo de derrame y de la rapidez de disipación en relación con la ubicación de los recursos sensibles a la contaminación. Los organismos más vulnerables son aquellos presentes en la superficie del mar o en la costa, las marismas salinas y los manglares costeros son hábitats costeros más sensibles (ITOPF, 2011b).

La presencia de hidrocarburos en el suelo modifica sus características. Cuando estos ingresan al suelo por la filtración o derrame de un tanque de almacenamiento de petróleo o de un oleoducto, ocurren diferentes procesos que influyen en el destino de estos compuestos en el suelo.

Los hidrocarburos pueden propagarse lateralmente en la superficie del suelo o pueden penetrar verticalmente por efecto de la fuerza de gravedad y la capilaridad. En el primer caso se favorece la volatilización de los componentes de bajo peso molecular, pero se incrementa el área contaminada y la foto oxidación de los hidrocarburos a compuestos polares más tóxicos. En el segundo caso, a mayor profundidad (lixiviación) se reduce la disponibilidad de oxígeno para la biodegradación y se incrementa el riesgo de contaminar la napa freática. La gran mayoría de hidrocarburos tiene un desplazamiento vertical en los suelos, a excepción de aquellos donde las condiciones climáticas favorecen su saturación con agua o su congelamiento (Buendía, 2012).

En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lento, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento (Bosco, Casale, Mazzarino, et al., 2019).

Según Ccolque y Vargas (2017) las propiedades físicas y químicas del suelo que son más afectadas por los derrames de hidrocarburos son: la estructura del suelo por la ruptura de los agregados, el incremento de la retención de agua en la capa superficial, el potencial hídrico,

la disminución del pH por la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos, el incremento del manganeso y hierro intercambiable y el incremento del fósforo disponible.

1.1.3 Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el ser humano.

Las vías de ingreso de los hidrocarburos al cuerpo de las personas pueden ser por vía respiratoria cuando se los inhala y cuando se los ingiere con los alimentos (cadena trófica), a través del agua y por contacto directo. Cuando ingresan por vía dérmica los contaminantes son absorbidos más lentamente que cuando son inhalados o ingeridos (Ponce, 2014).

Luego de ingresar estos son ampliamente distribuidos por la sangre y se transforman rápidamente en compuestos químicos pudiendo resultar más dañinos, así como menos peligrosos, esto en función de factores como el tipo, composición y la cantidad expuesta de hidrocarburos; la mayoría de los hidrocarburos abandonan el cuerpo a través de la orina o con el aire exhalado. Los constituyentes de los hidrocarburos, de bajo peso molecular (benceno, tolueno, xileno) afectan el sistema nervioso central, causan irritación de la piel, dolores de cabeza, náuseas, hormigueos en manos y pies, cuando la exposición es alta pueden provocar la muerte (Ponce, 2014).

Los principales peligros provenientes de elevadas concentraciones de hidrocarburos en general, están relacionados a los hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) principalmente por sus efectos cancerígenos. Se ha demostrado que el benceno es responsable de causar cáncer (leucemia) en los seres humanos, además la gasolina y benzopirenos son considerados como cancerígenos para humanos. El *n*-hexano afecta el sistema nervioso central de una forma diferente, causando un desorden nervioso llamado “neuropatía periférica” caracterizada por el entumecimiento de las extremidades y en casos graves, parálisis. Cuando se ingiere gasolina y kerosene, se produce irritación en la garganta y estómago, depresión del sistema nervioso central, dificultad para respirar y neumonía (Inca & Ortiz, 2018).

El pulmón es el órgano más vulnerable en la intoxicación por hidrocarburos. Y ésta aparece fundamentalmente por aspiración. Se produce una lesión directa de los capilares y el tejido pulmonar. El contacto con hidrocarburos produce irritación de la piel y picores, y la piel en este estado facilita la absorción de los componentes del crudo. Se ha asociado un aumento

del riesgo de cáncer de piel con la presencia de hidrocarburos poliaromáticos. También se produce la irritación de los ojos por contacto con gotas de crudo y algunos componentes pueden ser absorbidos a través de la córnea (Alonso, 2012).

1.1.4 Opciones de manejo de residuos petrolizados.

El manejo de residuos petrolizados debe considerarse como de alta prioridad. Es esencial que los planes de contingencia incluyan la provisión adecuada para el manejo de los residuos. Esto garantizará la selección de una adecuada opción de manejo disponible y minimizará los costos.

Un modelo útil a la hora de tratar la corriente de residuos que se origina a partir de cualquier fuente es la “jerarquía de los residuos” (figura 2), que proporciona una herramienta para estructurar una estrategia de manejo de los residuos (IPIECA, 2004; ITOPIF, 2011a).

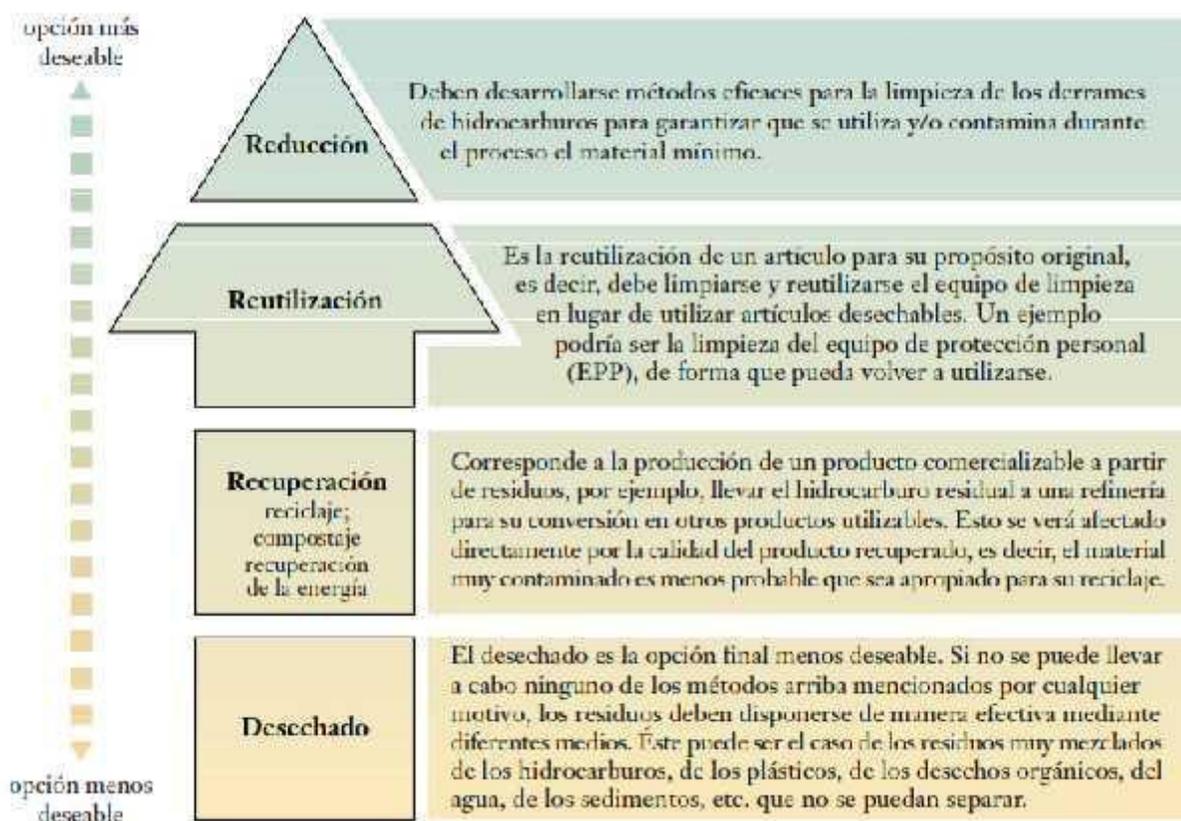


Figura 2. Modelo de “jerarquía de los residuos”. Fuente: (IPIECA, 2004).

Hay varias opciones posibles para el tratamiento, reciclaje y disposición final de los residuos de hidrocarburos. Cada uno de los tipos de residuos requerirá un método de tratamiento diferente. Éste estará determinado por varios factores que incluyen el costo, los recursos locales disponibles, la legislación y consideraciones ambientales (IPIECA, 2004; ITOF, 2011a).

En la remediación de residuos y suelos contaminados con hidrocarburos son utilizados procesos químicos, físicos y biológicos (Riser-Robert, 2019; Volke & Velasco, 2002). El uso de métodos de biorremediación es relativamente reciente y presentan ventajas respecto a los demás procesos (De Oliveira et al., 2018; Kumar et al., 2011; Thapa et al., 2012; Tyagi et al., 2011; Varjani, 2017; Yuniati, 2018).

Fabelo (2017) propuso una metodología para la recuperación de los suelos contaminados, incluidos con hidrocarburos. Comprende etapas de diagnóstico, caracterización, selección de la tecnología y su validación técnico económico a nivel de labor atorio y planta piloto. Asimismo, posteriormente se realiza el escalado y el diseño del proceso tecnológico (anexo 3).

1.2 Biorremediación.

El concepto de biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistema que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover, biodegradar o biotransformar compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos. Estos procesos biológicos involucran enzimas como catalizadores que modifican moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura y en sus propiedades toxicológicas. Se altera la estructura molecular y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. El término biotransformación a la transformación de un compuesto orgánico en otro similar, mientras que en la mineralización se produce la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua y residuos inorgánicos inertes (Ercoli, 2008; Eweis et al., 1998; Van Deuren et al., 1997; Velasco & Volke, 2003).

La biorremediación es un método de tratamiento apropiado para la degradación de hidrocarburos (Bosco, Casale, Mazzarino, et al., 2019; De Oliveira et al., 2018; Pérez, Viguera, Zamudio, Rivera, & Calva, 2017).

La biorremediación puede ocurrir por atenuación natural o aplicando métodos de bioestimulación y bioaumentación (Velasco & Volke, 2003).

Atenuación natural: consiste en la biotransformación natural, es decir utiliza los procesos físico-químicos que se dan entre el suelo y el contaminante de forma natural. Estos procesos reducen la concentración de los contaminantes por medio de la dispersión, volatilización, dilución, biodegradación y todas las reacciones que ayuden a la degradación del contaminante (Ponce, 2014).

Bioestimulación: implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo o residuos contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ. Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de oxígeno (Abduelbaset, Essabre, Aydinlik, Williams, & Williams, 2019; Bosco, Casale, Chiampo, & Godio, 2019).

Bioaumentación: esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores. Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Abduelbaset et al., 2019; Bosco & Mollea, 2019).

En resumen, la bioestimulación consiste en la adición de fuentes de nutrientes (N, P, K), para potenciar la actividad microbiana existente; y la bioaumentación es aplicada cuando no existe la cantidad de bacterias endógenas necesarias para aplicar el proceso degradativo y consiste en la inoculación de cepas de bacterias, hongos y microorganismos al proceso, aisladas del medio afectado (ONN, 2017).

En el anexo 4 se muestran algunas consideraciones a tener en cuenta para la biorremediación.

1.2.1 Factores que condicionan la degradación de hidrocarburos.

Según Moliterni (2016) la biorremediación está condicionada por factores medioambientales, microbiológicos, físicos y químicos.

Factores medioambientales: los factores medioambientales proporcionan las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos. Estos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad.

- pH: el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro, mientras que es más ácido para los hongos (pH 4 - 5). La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre (Prakash et al., 2015).
- Temperatura: es uno de los factores ambientales más importantes para la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 20 y 30 °C, decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C (Barrios, 2011; Martínez, Lam, Cormack, & Balboa, 2017)
- Humedad: los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación. No obstante, el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica (Laura, 2012).
- El oxígeno: es el aceptor final de electrones empleado en procesos biológicos aeróbicos. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El proceso de oxidación da lugar a electrones que

intervienen una cadena de reacciones en el interior de la célula y, al final, deben ser vertidos en el entorno. El aceptor final de electrones es el receptor de los mismos y, en el caso de un metabolismo aerobio, O₂ es el aceptor y H₂O es el producto (Harayama, Kasia, & Hara, 2004).

- Nutrientes inorgánicos: son fundamentales para la reproducción microbiana. Los nutrientes principalmente requeridos son el P y el N. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encontrasen en el rango normal se deben adicionar al medio mediante enmiendas. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1 (EPA, 2017; Yuniati, 2018).
- Factor microbiológico : el factor microbiológico más importante en la biorremediación es la transformación biológica de compuestos orgánicos, catalizada por acción de las enzimas. Estas son específicas en términos de los compuestos que atacan y las reacciones que catalizan. Más de una enzima es normalmente requerida para romper una sustancia orgánica. Frecuentemente, los organismos que tienen las enzimas para degradar están presentes en el suelo (Ortiz et al., 2005).

Factores físicos: según Torres y Zuluaga (2009) los factores físicos de mayor importancia en la biorremediación son la biodisponibilidad y la presencia de agua.

- Biodisponibilidad: la tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masa del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. La adsorción, absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes. Un fenómeno que afecta de forma negativa a la biodisponibilidad de los contaminantes es el envejecimiento de los microorganismos (Torres & Zuluaga, 2009).
- Presencia de agua: los microorganismos toman el carbono orgánico, los nutrientes inorgánicos y los aceptores de electrones, necesarios para el crecimiento microbiano, de la fase líquida. Por lo tanto, el agua debe estar presente en cantidades que permitan el desarrollo de las comunidades microbianas. Sin embargo, esta puede llegar a inhibir el

flujo de aire y reducir el suministro de oxígeno necesario para la respiración microbiana (Torres & Zuluaga, 2009).

Factores químicos: el factor químico más importante en la biorremediación es la estructura molecular del contaminante. Su capacidad para ser biodegradado está relacionada con la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes (Laura, 2012).

- Estructura molecular: la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular, siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica. De manera general cuanto más insaturado sea una cadena carbonatada (más dobles y triples enlaces) más difícil o lenta será su degradación. De igual manera los alcanos de cadena larga son más resistentes a la biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta. Cuando alcanzan un peso molecular superior a 500 dejan de servir como fuente de carbono para el crecimiento microbiano (Silva, 2018).

En el anexo 5 se muestran otros factores específicos que condicionan la biodegradación de hidrocarburos.

1.2.2 Fundamentos bioquímicos de la degradación de hidrocarburos.

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se producen una serie de reacciones de oxidación-reducción cuyo fin es la obtención de energía (Izquierdo, 2014). Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro III, los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Torres & Zuluaga, 2009). Las reacciones que se producen en ambos procesos se pueden observar en el anexo 6.

La ruta metabólica más eficaz para la biorremediación de hidrocarburos es la respiración aerobia, que se soporta en un rango amplio de reacciones de oxidación-reducción que se producen en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células. La cadena

la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia y el aceptor es el oxígeno, que es incorporado en las moléculas por enzimas oxigenasas y luego transcurren reacciones enzimáticas secuenciales hasta llegar al producto final. Actúan todos los tipos de enzimas, pero sobresalen las degradativas porque son las encargadas de reducir la concentración de contaminantes y le permiten a la célula utilizar compuestos orgánicos como sustrato (alimento) (Figueras et al., 2005; Núñez, 2003).

En el proceso de degradación los microorganismos utilizan de los hidrocarburos el carbono como única fuente de energía y nutrientes, y transcurre mediante procesos de oxidación secuencial o progresiva, a través de mecanismos de α , β y ω oxidación, desde los compuestos más susceptibles (saturados y aromáticos) hasta los más resistentes (resinas y asfáltenos), hasta la mineralización formando CO_2 y H_2O (Figueras et al., 2005; Núñez, 2003).

Entre las vías metabólicas principales para degradar los hidrocarburos están: la oxidación terminal, la oxidación subterminal y la β -oxidación (que deriva en parte de la oxidación terminal). El paso clave radica en oxidar la molécula para incrementar la solubilidad. La mayoría de los microorganismos convierten el n-alcano al correspondiente alcohol terminal, por medio de la monooxigenasa, la cual hidroliza el carbono del carbono terminal mayoritariamente (ruta de la oxidación terminal) mediante el átomo de una molécula de oxígeno. Los pasos posteriores, en la oxidación terminal, convierten el n-alcohol en aldehído (alcohol-deshidrogenasa) y finalmente se forma un ácido graso (aldehído-deshidrogenasa). El ácido graso entonces puede entrar en la ruta de la β -oxidación. También puede producirse una oxidación terminal del ácido graso produciéndose un diácido (β -oxidación) que también entraría en la β -oxidación, mediante una descarboxilación previa (Braibant, 2004). En el anexo 7 se representa la ruta de degradación de los alcanos por oxidación terminal del grupo metil terminal, subterminal y biterminal.

Los hidrocarburos monoaromáticos son degradados inicialmente mediante una degradación enzimática de los compuestos contaminantes lo cual es referido como una biodegradación primaria. En la biodegradación aerobia y anaerobia de compuestos aromáticos se llevan a cabo 4 fases (Ming et al., 2015):

1. Entrada en la célula por difusión o por mecanismos específicos de transporte.
2. Activación de anillo aromático, mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular dentro del anillo por medio de las dioxigenasas formando un dihidrol.
3. Rotura del anillo, los dihidroles son oxidados hasta intermediarios como el catecol los cuales son los encargados de la ruptura del anillo aromático.
4. Aprovechamiento de los productos, el catecol es oxidado por vía orto, esta vía sigue una serie de reacciones enzimáticas con el fin de producir ácidos orgánicos de bajo peso molecular y aldehídos que son incorporados por la célula al ciclo de los ácidos tricarbónicos.

En el caso de los hidrocarburos aromáticos, la degradación del benceno es similar a la de los otros aromáticos. El benceno es digerido por las dioxigenasas que provocan la ruptura del núcleo por hidroxilación de manera que la molécula sea químicamente más accesible (Braibant, 2004). En el anexo 8 se muestra este mecanismo.

Si la bacteria degradadora posee todas las enzimas necesarias, la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono puede conducir a su completa mineralización (conversión de una parte de los elementos que los integran en productos inorgánicos como dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O)). En cambio, a menudo se produce un metabolito intermediario que no es reconocido como sustrato por algunos de las enzimas de la vía, dando lugar a una degradación parcial. Cuando esta transformación no produce carbono para el crecimiento se habla de cometabolismo.

La degradación parcial y el cometabolismo son producto de la baja especificidad de algunas enzimas presentes en las rutas metabólicas de degradación, y parecen jugar un papel importante en la degradación de contaminantes en el medio ambiente (Izquierdo, 2014).

En la literatura (Abioye, Aziz, & Agamuthu, 2010; Mohajeri, Aziz, Isa, & Zahed, 2010, 2013; Thapa et al., 2012) se reconoce que las tasas de degradación de hidrocarburos en la biorremediación pueden ser descritas por los modelos cinéticos utilizados y que la cinética se ajusta en su mayoría a cinéticas de primer orden y segundo orden.

También González (2019) obtuvo que la cinética de la degradación de hidrocarburos (GyA e HTP) utilizando la ecotecnología de biopilas a escala semipiloto (escala de banco) tuvo un mejor ajuste al modelo de segundo orden, fundamentado por la naturaleza compleja del

residual petrolizado e incidiendo en gran medida en su biodegradabilidad. Su biorremediación transcurre a través de procesos de oxidación secuencial o progresiva, mediante mecanismos de α , β y ω oxidación hasta llegar a la mineralización.

1.2.3 Microorganismos en la biorremediación.

Existen varias clases de microorganismos: bacterias, actinomicetos, mohos, levaduras, protozoos, algas y virus (Torres & Zuluaga, 2009).

Las bacterias desempeñan el papel de mayor importancia en la biodegradación, además de ser el grupo de organismos más abundante en los suelos. Dichos organismos son los principales degradadores de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos encontrados en el suelo. Las más comunes son *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Flavabacterium* (Bosco & Mollea, 2019).

Por su diversidad, las bacterias se encuentran regularmente en comunidades heterogéneas; algunas especies son degradadores primarios, es decir, ellas inician la degradación de la materia orgánica en el suelo; otras crecen en compuestos resultantes de la degradación parcial de complejos orgánicos o productos residuales de degradadores primarios (Snelgrove, 2010).

Los aerobios estrictos son bacterias que requieren oxígeno como aceptor final de electrones y crecen solamente en presencia del mismo. Las aerobias facultativas son bacterias que pueden utilizar aceptores de electrones terminales alternativos y crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Algunas anaerobias son tolerantes al oxígeno, pero éste es tóxico a muchas anaerobias estrictas. Las bacterias también se pueden clasificar como eutofas, las cuales crecen en presencia de altas concentraciones de sustratos, y oligotofas, las cuales crecen con concentraciones trazas (EPA, 2017).

Los actinomicetos son un grupo intermedio entre las bacterias procariotas más primitivas y los hongos eucariotas; éstos están presentes en un gran número de suelos. Toleran un intervalo amplio de pH y temperatura, crecen bajo condiciones limitadas de nutrientes y son resistentes a desecación por lo que predominan cuando las condiciones del medio son difíciles (Patricia, 2019).

Los microorganismos aislados en suelos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación de algunas fracciones del petróleo, haciéndolos susceptibles a ataques secundarios y facilitando su conversión a CO₂ y H₂O (Torres & Zuluaga, 2009).

Uno de los géneros bacterianos más explotados en bioprocesos no convencionales es el *Rhodococcus*, un grupo único consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos (Bosco, Casale, Mazzarino, et al., 2019).

El *Rhododoccus* posee una gran variedad de vías metabólicas para la degradación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de dioxigenasa y monooxigenasa sobre anillos, así como la actividad de ruptura de catecol. Algunas cepas presentan también la vía del 3-oxoadipato. Lo anterior sumado a su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes y su persistencia ambiental las hacen excelentes candidatas para los tratamientos de biorremediación (Torres & Zuluaga, 2009).

Los hongos también metabolizan compuestos orgánicos, pero no son tan eficientes como las bacterias, estos son altamente protistas, no tienen movimiento y emplean materia orgánica como fuente de carbono y energía.

En comparación con las bacterias, los hongos son menos numerosos y crecen a velocidades considerablemente bajas; además, los procesos metabólicos de estos son menos diversos. Como grupo, los hongos tienden a ser más tolerantes a los ácidos que las bacterias (muchas especies crecen a un pH óptimo de 5) y son más sensibles a la variación en la humedad (Ccolque & Vargas, 2017).

La población de bacterias degradadoras en suelos no contaminados varía de 1×10^3 a 1×10^4 UFC/g y en suelos contaminados de 1×10^6 a 1×10^8 UFC/g (Ñustez, Paredes, & Cubillos, 2014). El anexo 9 muestra la lista de microorganismos descritos como degradadores de diferentes compuestos de hidrocarburos del petróleo.

1.3 Tecnologías de biorremediación de residuos contaminados con hidrocarburos.

Según Volke y Velasco (2002) la selección de una tecnología de remediación depende de los siguientes criterios:

1. Características ambientales, geográficas, demográficas, hidrológicas y ecológicas del sitio.
2. Tipo de contaminante, concentración y características físico - químicas.
3. Propiedades fisicoquímicas del residuo petrolizado.
4. Costo de las posibles tecnologías a aplicar.

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse con base en los siguientes principios: (1) estrategia de remediación; (2) lugar en que se realiza el proceso de remediación, y (3) tipo de tratamiento (EPA, 2007; Van Deuren et al., 1997; Volke & Velasco, 2002).

1. Estrategia de remediación: son tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto, para remediar la mayoría de los sitios contaminados:
 - Destrucción o modificación de los contaminantes: este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.
 - Extracción o separación: los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica).
 - Aislamiento o inmovilización del contaminante: los co ntaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.
2. Lugar de realización del proceso de remediación : en general, se distinguen dos tipos de tecnología:
 - *In situ*: son las aplicaciones en las que el suelo o el residuo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del suelo contaminado, sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.
 - *Ex situ*: la realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo o el residuo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (*on site*) o fuera de él (*off site*).
3. Tipo de tratamiento: esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento:
 - Tratamientos biológicos (biorremediación) : utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.

- Tratamientos físico – químicos. este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
- Tratamientos térmicos: utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

Además de las clasificaciones anteriores, las tecnologías de remediación pueden clasificarse con base en el tiempo que llevan en el mercado y al grado de desarrollo en el que se encuentran, en tecnologías tradicionales (4) y en tecnologías innovadoras (5) (EPA, 2007).

4. Tecnologías tradicionales. Son tecnologías utilizadas comúnmente a gran escala, cuya efectividad ha sido probada. La información disponible acerca de costos y eficiencia es de fácil acceso. Entre las tres tecnologías tradicionales usadas con mayor frecuencia, se encuentran: la incineración, la solidificación/estabilización, la extracción de vapores y la desorción térmica.
5. Tecnologías innovadoras. Son tecnologías que pueden encontrarse en diferentes etapas de desarrollo (investigación, escala piloto o gran escala). Su limitado número de aplicaciones genera la falta de datos acerca de sus costos y eficiencias. En general, una tecnología de tratamiento se considera novedosa si su aplicación a gran escala ha sido limitada.

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de suelos y residuos contaminados es relativamente reciente y presenta varias ventajas respecto a otras tecnologías de remediación. Algunas de estas ventajas son: bajos costos de instalación y operación; es una tecnología simple y de fácil aplicación; es un tratamiento seguro con un mínimo de riesgos a la salud y es tecnológicamente efectivo (Kumar et al., 2011). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha publicado varias guías con la finalidad de proporcionar información y ayudar a identificar y seleccionar tecnologías de biorremediación (EPA, 2005a, 2005b, 2012).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse in situ o ex situ (las ventajas y desventajas de ambas se pueden observar en el anexo 10), en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) (Dzionic, Wojcieszńska, & Guzik, 2016).

1.3.1 Tecnologías en situ.

Bioventeo, Bioaireación o Bioventilación: utiliza microorganismos endógenos para degradar contaminantes tanto del subsuelo como de las aguas subterráneas contaminadas, mediante aireación forzada, cuando la actividad biológica de la bacteria endógena se estimula por medio de la inyección de aire a través de pozos de ventilación. Los pozos se instalan en varios puntos del área contaminada y a través de ellos se inyectan nutrientes y soluciones específicas preparadas en los laboratorios. Puede aplicarse la bioestimulación o la bioaumentación (Ccolque & Vargas, 2017; ONN, 2017).

Biolabranza o Landfarming in situ: es una técnica de la biorremediación en la que los residuos son dispersados y mezclados a la capa fértil de la tierra, de una manera controlada, para que la propia flora microbiana actúe como agente de degradación. El proceso es realizado en grandes áreas y la biodegradación ocurre en la capa superior del suelo (desde los primeros 30 cm a 50 cm de profundidad), donde la respiración aerobia es garantizada mediante la aireación, la que puede efectuarse mecánicamente mediante el ruster de un Buldócer o el arado de un tractor. Al sistema se le adicionan nutrientes y agua e incluye la colección de lixiviados (EPA, 2017; ONN, 2017; Simanca, 2017; Volke & Velasco, 2002).

Fitorremediación: consiste en el uso de plantas para limpiar agua y suelo contaminados. Como método correctivo es una técnica pasiva y se usa como complemento de otros métodos de limpieza mecánicos en la etapa de acabado, eliminando los últimos restos de contaminantes presentes en el suelo que a veces quedan con las técnicas biológicas o mecánicas de tratamiento (Ccolque & Vargas, 2017; ONN, 2017).

1.3.2 Tecnologías ex situ.

Biolabranza o Landfarming ex situ: Similar a la descrita en el acápite anterior, pero ex situ. Puede aplicarse la bioestimulación o la bioaumentación (Ccolque & Vargas, 2017).

Composteo: es un proceso biológico controlado, en el que los suelos y residuos contaminados se mezclan con agentes de volumen, sustancias orgánicas sólidas biodegradables, adicionadas para mejorar el balance de nutrientes, así como para asegurar una mejor aireación y la generación del calor durante el proceso. Predomina el método de bioestimulación (Velasco & Volke, 2003).

1.4 Ecotecnología de Biopilas.

La ecotecnología de biopilas es una tecnología ex situ, que es pertinente para la biorremediación de residuos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos (EPA, 2017; Ercoli, 2008; Volke & Velasco, 2002). Es una forma de composteo en el cual se forman montículos o pilas de suelo, residuos petrolizados y texturizantes, acondicionantes y/o mejoradores. Estos materiales son residuos orgánicos, de origen agrícola o industrial, que aportan nutrientes y flora microbiana, mejoran la porosidad y la aireación, y mantienen los niveles de humedad. La bioestimulación de la actividad microbiana mediante la adición de nutrientes, la aireación y la humedad, favorece la biodegradación y mineralización de los hidrocarburos (Prakash et al., 2015; Snelgrove, 2010; Velasco & Volke, 2003).

El material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), que son sustancias orgánicas sólidas biodegradables, adicionadas para mejorar el balance de nutrientes, así como para asegurar una mejor aireación y la generación del calor durante el proceso (Eweis et al., 1998).

Silva (2018) demostró que la aplicación de texturizantes mejora la aireación, la porosidad y disminuyen los niveles de humedad y la combinación de texturizantes y enmiendas con los macronutrientes nitrógeno y fósforo, activan la flora microbiana autóctona en los suelos.

El bagazo de caña, rastrojo de maíz, paja de avena, cascara de naranja y aserrín de madera, han sido utilizados como enmiendas y texturizantes, incrementando la porosidad del medio y por lo tanto la aerobiosis del sistema que funcionan como una buena fuente de carbono y como aporte de microorganismos ligninolíticos (Ordaz et al., 2011).

La cachaza tiene la capacidad de mejorar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo por lo que resultó ser una alternativa para ser utilizada en los procesos de remoción de contaminantes en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, con resultados semejantes a los alcanzados con el bagazo de caña de azúcar. La cachaza presenta la ventaja de aportar microorganismos al suelo con la capacidad de biotransformar los tóxicos, e incrementa de manera temporal la capacidad de intercambio catiónico y retiene la humedad.

Buendía (2012) recomienda el uso de estiércoles orgánicos, como vacaza y cerdaza más aserrines de especies maderables del tipo suave (bolaina y pino) como fuente de remediación para suelos contaminados con hidrocarburos, además porque representa una tecnología de 24

bajo costo y de fácil manejo, para mejorar la resiliencia del suelo. Los microorganismos existentes en la materia orgánica (estiércol y aserrines) restablece el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas e incrementando la reducción de la contaminación del suelo.

Al sistema, que puede ser abierto o cerrado, se adicionan nutrientes y agua e incluye la colección de lixiviados y la aireación, la que puede efectuarse mecánicamente mediante el volteo de la composta y/o por medio de un sistema de inyección (compresor) o extracción (vacío) de aire, mediante tubos colocados en la base alineados paralelamente a lo largo de la pila (Ccolque & Vargas, 2017; EPA, 2017; ONN, 2017).

Las biopilas son tratamientos de operación sencilla y costo reducido, se dispone de un tiempo adecuado, puede ser de meses a años; la disminución de la concentración de los contaminantes permite que las tierras puedan ser reutilizadas o gestionadas como residuo inerte (Ccolque & Vargas, 2017).

La biorremediación de hidrocarburos en la ecotecnología de biopilas transcurre por un proceso de respiración aeróbica a partir de reacciones de oxidación-reducción que se producen en la cadena respiratoria. Los microorganismos utilizan el carbono de los hidrocarburos como única fuente de energía y nutrientes. En dependencia de la composición del hidrocarburo se producen procesos de oxidación secuencial o progresiva, mediante mecanismos de α , β y ω oxidación hasta la mineralización u oxidación completa produciendo CO_2 y H_2O . Estos procesos oxidativos comienzan con las fracciones más susceptibles: saturadas y aromáticas, hasta los más resistentes: resinas y asfaltenos (Figueras et al., 2005; Núñez, 2003; Riser-Robert, 2019).

Dos de los sistemas de biopilas más empleados son las biopilas alargadas y las biopilas estáticas, las cuales se observan en el anexo 11. La diferencia entre ambas tecnologías radica en el método de aireación que se emplea para proveer de oxígeno al proceso de composteo.

1.4.1 Factores que intervienen en la ecotecnología de biopilas.

En la biorremediación, mediante la ecotecnología de biopilas, intervienen un número considerable de factores o variables, resumidos en tres categorías: las características del suelo, las características de los contaminantes, y las condiciones climáticas (BATTELLE &

NFESC, 1996; Chardoul, O'Brien, Clawson, & Fletcher, 2015; EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003; Yuniati, 2018).

1. Características del suelo: en esta categoría se encuentra los siguientes factores:
 - Densidad de población microbiana: para que la ecotecnología de biopilas sea efectiva el suelo utilizado en la misma debe tener una concentración de bacterias heterótrofas totales mayor que 1 000 CFU/g de suelo (EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003).
 - pH del suelo: el pH del suelo debe estar entre el rango de 6 a 8 con el valor de aproximadamente 7 siendo el óptimo. Este puede ser aumentado mediante la adición de cal y disminuido adicionando azufre durante la construcción (EPA, 2017).
 - Humedad: los microorganismos del suelo requieren de un suelo húmedo para su adecuado crecimiento, sin embargo una humedad excesiva del suelo restringe el movimiento de aire a través de la superficie, reduciendo así la disponibilidad de oxígeno. Por tanto el suelo no debe encontrarse ni seco ni empapado, su rango ideal de humedad debe oscilar entre un 40 a un 85 % de su capacidad de retención de agua o entre un 12 a un 30 % en peso (EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003).
 - Temperatura del suelo: La actividad microbiana del suelo a temperaturas por debajo de 10 °C decrece significativamente y esencialmente cesa por debajo de 5 °C. La actividad microbial de la mayoría de las bacterias importantes para la degradación de los hidrocarburos de petróleo también disminuye a temperaturas mayores a 45 °C. El rango óptimo de temperatura está entre 10 °C y 45 °C. La velocidad de la actividad microbial típicamente se duplica por cada 10 °C de aumento de temperatura (Barrios, 2011; EPA, 2017).
 - Concentración de nutrientes: estos nutrientes pueden que estén en el suelo en cuestión pero frecuentemente deben ser añadidos al suelo de la biopila para mantener la población bacteriana. La proporción recomendada de C:N:P:K para la biodegradación oscila en los rangos de 100:10:1:0,1 hasta 100:1:0,5:0,1 dependiendo de los constituyentes específicos y los microorganismos involucrados en el proceso biodegradativo (EPA, 2017).
 - Textura del suelo: afecta la permeabilidad, el contenido de humedad y la densidad de partícula del suelo. Esta debe ser considerada para asegurar que la adición de oxígeno, la distribución de nutrientes y el contenido de humedad del suelo puedan ser mantenidos

dentro de los rangos efectivos. En dependencia de las características del suelo, este se debe mezclar con un porcentaje de texturizante el cuál mejora su textura, aporta micronutrientes a la flora microbiana del mismo y ayuda a mantener la humedad en los rangos óptimos (EPA, 2017).

2. Características del contaminante: agrupa tres factores a tener en cuenta:

- Volatilidad: los constituyentes volátiles tienden a evaporarse de la biopila durante la extracción o inyección de aire, en lugar de ser degradados por las bacterias, por lo que no es recomendable usar esta tecnología cuando los residuos petrolizados presentan temperaturas de ebullición relativamente bajas. En general la gasolina, el queroseno y los combustibles diésel contienen constituyentes con suficiente volatilidad como para evaporarse de la biopila (EPA, 2017).
- Estructura química del contaminante: es importante en la determinación de la velocidad de degradación, casi todos los constituyentes del petróleo son biodegradables, por lo que a mayor complejidad estructural de las moléculas del constituyente más difícil y menos rápido es el tratamiento biológico mientras que menor sea el peso molecular (entre nueve o menos átomos de carbono) más fácil será biodegradado (EPA, 2017).
- Concentración del contaminante: la presencia de muy altas concentraciones de compuestos orgánicos del petróleo o de metales pesados en el suelo puede ser tóxico o inhibir el crecimiento y reproducción de las bacterias responsables de la biodegradación en las biopilas, siendo controversialmente que bajas concentraciones de material orgánico producirá niveles de actividad microbiana disminuidos. Por lo general concentraciones en el suelo de HTP fuera del rango de 10 000 a 50 000 mg/kg o de metales pesados excediendo los 2 500 mg/kg son consideradas inhibitoras o tóxicas para la mayoría de microorganismos (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017).

3. Condiciones climáticas: destacan tres factores a tener en cuenta a la hora de aplicar la ecotecnología de biopilas relacionados con el clima, esto son:

- Temperatura ambiente: es importante porque influye en la temperatura de los suelos de las biopilas y esta a su vez impacta en la actividad bacteriana y por consiguiente en la biodegradación, el rango óptimo de la temperatura en la biopila es de 10 – 45 °C (Yuniati, 2018).

- Lluvias: la lluvia que cae en el área de las biopilas aumenta el contenido de humedad del suelo y causa erosión. Por lo que se debe considerar un protector para las biopilas como puede ser una lona, un túnel de plástico, o una estructura en forma de invernadero (EPA, 2017).
- Viento: La erosión del suelo de las biopilas puede producirse durante periodos ventosos. Esta puede ser limitada aplicando humedad periódicamente a la superficie de las biopilas o mediante el cubrimiento de las mismas (EPA, 2017).

Entre los factores o variables de operación más investigados para mejorar la eficacia de la ecotecnología de las biopilas están: concentración de hidrocarburos, porcentaje de texturizante, porcentaje de humedad, y relación C:N:P :K. El resto de los factores pueden considerarse controlables y no controlables. EPA (2017), propuso una lista de chequeo para evaluar la pertinencia del uso de la ecotecnología de biopila la cual se puede observar en el anexo 12. Asimismo, en los anexos 13 y 14 se pueden ver los árboles de decisión (diagrama de flujo) desarrollados por BATTELLE y NFESC (1996), y EPA (2017) respectivamente, para la selección y evaluación de la pertinencia de la tecnología de biopilas en base a estos factores.

1.4.2 Ventajas y desventajas de la ecotecnología de biopilas.

La EPA (2017), discute las ventajas y desventajas de esta ecotecnología ver anexo 15. Entre las ventajas se destacan: bajos tiempos de tratamientos, costos asequibles, requiere menos área que el método de landfarming, es relativamente simple de diseñar e implementar. Entre las desventajas se refieren: difícil reducción de concentración de más del 95 %, puede no ser muy efectiva para altas concentraciones de constituyentes, los constituyentes volátiles tienden a evaporarse en vez de ser biodegradados durante el tratamiento, la presencia de concentraciones elevadas de metales pesados pueden inhibir el crecimiento microbiano.

Una de las ventajas de esta ecotecnología ex situ es el poder controlar algunas de sus variables de operación con el objetivo de optimizar el proceso de biorremediación (Velasco & Volke, 2003).

1.5 Diseño ingeniero de las biopilas.

Existen principios y criterios de diseño establecidos para el desarrollo de la ecotecnología biopilas:

1. Escala de la investigación (Snelgrove, 2010; Volke & Velasco, 2002) y principios de escalado (Behrentz & Giraldo, 1999) para asegurar la representatividad del comportamiento del proceso al variar las dimensiones.
2. Aplicabilidad de los principios básicos de diseño del compostaje tradicional (Román, Martínez, & Pantoja, 2013).
3. La morfología y dimensiones de la biopila dependerán de los factores de experimentación recomendados (Ercoli, 1998, 2008; Eweis et al., 1998; Velasco & Volke, 2003), del volumen y masa total inicial, del volumen y masa total final, y del área disponible.
4. La composición y contenido de los agentes de volumen o texturizantes es un factor clave en el diseño. Si bien pudiera influir en un aumento en la velocidad de biodegradación de los contaminantes, si se emplea una gran cantidad se incrementa el área necesaria para el tratamiento debido a la baja densidad aparente de los mismos (Velasco & Volke, 2003).
5. Características complejas de los sistemas de compostaje aeróbicos a escala de laboratorio, ya que al reducirse las dimensiones se favorece el aumento de la relación entre el área superficial y el volumen, independiente de la geometría (Behrentz & Giraldo, 1999). Estas condiciones si bien favorece la necesaria aireación para el proceso de biorremediación (Ercoli, 1998; Iturbe, Flores, Chávez, & Roldán, 2002; Snelgrove, 2010; Velasco & Volke, 2003), impide que se acumule el calor de reacción y que se logre de manera natural lograr las mismas temperaturas del proceso que caracterizan este tipo de sistemas a escalas reales de operación (Behrentz & Giraldo, 1999).
6. Predominio en todas las escalas de desarrollo de la tecnología el diseño de biopilas alargadas con forma de paralelepípedo y pirámide truncada, disposiciones que proporcionan una compensación en tre la superficie y el volumen, y permite el tratamiento de un gran volumen de suelo utilizando un tamaño superficial moderado del terreno, minimizando la volatilización del contaminante y los requisitos de la geomembrana. En este tipo de configuración, el centro del trapecio está aislado de las fuerzas convectivas que tienen lugar en la superficie de la hilera. Además, representa una configuración

adecuada para soportar fuertes vientos (BATTELLE & NFESC, 1996; Chardoul et al., 2015; EPA, 2017; Román et al., 2013).

7. La consideración del ángulo de reposo o inclinación de la masa de la biopila es un elemento de seguridad fundamental en el diseño de la biopila, para asegurar que no habrá deslizamiento de material y evitar que se destruya o desmorone. El ángulo natural de reposo es una propiedad de los materiales granulares, y es el ángulo que se forma en un plano vertical cuando se vierte el material sobre una superficie horizontal, entre dicha superficie y la generatriz del cono formado. Al aumentarse el valor de este ángulo el sólido comenzará a deslizarse hacia abajo (Rosabal & Valle, 2010). Depende principalmente de la compacidad, granulometría, densidad y porosidad del material. (Iturbe et al., 2002). Ángulos hasta 35° indican que el material puede fluir libremente, entre 35 - 45° indican que el material es algo cohesivo, mientras que ángulos entre 45 y 55° señalan una gran cohesividad del material. Para suelos el ángulo de reposo oscila entre 30° y 45°. BATTELLE y NFESC (1996); EPA (2017); Ercoli (2008) y Wu y Coulon (2015), reportan diseños de biopilas para aplicaciones a gran escala con ángulo de entre 45° y 65°.
8. La elección del tipo de sistema de biopilas depende de las condiciones climáticas y de la estructura de los compuestos orgánicos volátiles presentes. Los sistemas cerrados son recomendados para mantener la temperatura, evitar la saturación de agua debido a la lluvia, así como disminuir la evaporación de agua y de los compuestos orgánicos volátiles (Eweis et al., 1998; Velasco & Volke, 2003; Volke & Velasco, 2002).

Las fases involucradas en la construcción de biopilas según BATTELLE y NEFSC (1996) implican:

Preparación del sitio: constituye el primer paso ya que su objetivo es la evacuación del sitio respecto al flujo de material, acceso a utilidades, entradas y salidas del sitio, medidas de seguridad existentes y la disposición espacial general. Antes de la construcción y almacenaje de las biopilas se establece una limpieza del sitio en cuestión eliminándose escombros y otros obstáculos. Si en el sitio existe una superficie de asfalto o concreto, esta superficie puede ser usada como cimiento para el área de montaje y almacenamiento, en caso de no existir esta superficie los cimientos área de montaje y almacenamiento deben ser contruidos usando suelo limpio compactado o arcilla (BATTELLE & NFESC, 1996).

Construcción de la base: la base de la biopila tiene tres funciones básicas: proporcionar una cimentación estable para soportar la biopila, así como el manejo de las operaciones requeridas, proporcionar una barrera contra la migración potencial del contaminante en el suelo subyacente y evitar el almacenamiento de lixiviados en la base de la biopila (Iturbe et al., 2002).

Adición de nutrientes: los nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) pueden ser añadidos a través de una disolución de ellos en agua y luego rociar la solución al suelo durante el proceso de mezclado, o pueden ser añadidos en forma de polvo o gránulos (BATTELLE & NFESC, 1996).

Humidificación del suelo: tener un suficiente contenido de humedad en la biopila, aunque no hay una relación lineal entre la capacidad de campo y el porcentaje peso de humedad es uno de los factores críticos para una biodegradación de contaminantes exitosa. En climas moderados, una biopila generalmente pierde del 1 al 2 % peso del agua original, por lo tanto si la biopila se encuentra suficientemente hidratada cuando va a ser construida no se precisan sistema de irrigación. El agua puede ser añadida por distintas vías de acuerdo a BATTELLE y NFESC (1996):

1. Añadir el agua a medida que la biopila es construida.
2. Instalar un sistema de irrigación por goteo a lo largo de la cima de la biopila.
3. Hidratar el suelo cuando todavía se encuentra en la zona de almacenaje.
4. Sistema de recolección de lixiviados.

El sistema de configuración de las biopilas debe minimizar la formación de lixiviados por lo que la construcción de un sistema recolector de lixiviados no es necesario, a menos que las condiciones lo requieran. El agua recolectada puede reutilizarse, debido a que contienen nutrientes (en bajas concentraciones) que no se absorbieron. La reutilización dependerá de los requerimientos de humedad, nutrientes y del volumen de lixiviados recolectados (Martín & Arguelles, 2002).

1.6 Diseño de experimento.

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Esta

metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor, situaciones complejas de relación causa -efecto. Un experimento es un cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio sobre una o varias propiedades del producto o resultado (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

El diseño estadístico de experimentos es la forma más eficaz de hacer pruebas. Consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

El diseño de experimentos (DDE) es un conjunto de técnicas activas, en el sentido de que no esperan que el proceso mande las señales útiles, sino que éste se “manipula” para que proporcione la información que se requiere para su mejoría (Montgomery, 2017).

En todo proceso intervienen distintos tipos de variables o factores como los que se muestran en la figura 3, donde también se aprecian algunas interrogantes al planear un experimento (Gutiérrez & De la Vara, 2012).



Figura 3. Variables de un proceso y preguntas a responder al diseñar un experimento. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Según Gutiérrez y De la Vara (2012) las etapas y actividades de un diseño de experimento son:

1. *Planeación y diseño:*

- Definir el problema o el objetivo
- Hacer un esquema del estudio donde se señale el problema planteado.
- Determinar los factores que deben investigarse, de acuerdo a su posible impacto en el problema.
- Elegir la(s) variable(s) de respuesta que será(n) medida(s) en cada punto del diseño y verificar que se miden de manera confiable. Estas variables son el objetivo del experimento, ya que son las variables de salida o críticos de la calidad que se quieren corregir o impactar.
- Seleccionar el diseño experimental adecuado a los factores que se tienen y al objetivo del experimento.
- Planear y organizar el trabajo experimental.
- Realizar el experimento

2. *Análisis e interpretación:*

- Hacer un análisis detallado de los resultados experimentales.
- Interpretar resultados
- Hacer corridas confirmatorias del proceso en el mejor tratamiento.

3. *Conclusiones finales:*

- Cerrar y concluir el proyecto adecuadamente.

En el anexo 16 se muestran las etapas del diseño de experimentos, las preguntas de entrada y las salidas más relevantes.

De acuerdo con Gutiérrez y De la Vara (2012) los diseños de experimentos se pueden clasificar en varios grupos de acuerdo con sus objetivos tal y como se observa en el anexo 17.

1.6.1 Metodología de Superficie y Respuesta.

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), introducida por Box y Wilson, es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas para diseñar experimentos, construir modelos, evaluar los efectos de factores y buscar condiciones óptimas de factores para respuestas de procesos y formulaciones complejas (Martínez, Lo Balbo, Mac Cormack, & Ruberto, 2015). El proceso de optimización de esta metodología se enfoca en estudiar la

respuesta de las combinaciones diseñadas estadísticamente, estimar los coeficientes ajustándolos a un modelo matemático que se adapte mejor a las condiciones experimentales, prediciendo la respuesta del modelo ajustado y verificando la adecuación de la manera deseable (Narciso & Paucar, 2019).

La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características del producto. Implica tres aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización (Gutiérrez & De la Vara, 2012):

1. El diseño implica que, para optimizar un proceso, basado en el conocimiento acerca de la posible ubicación del punto óptimo y el modelo de regresión que se quiere ajustar, se debe aplicar el diseño de experimentos, en particular aquellos que sirven para ajustar un modelo.
2. El modelo es la ecuación matemática que relaciona la variable de respuesta con los factores estudiados en el diseño. Puede ser de primero o segundo orden (plano o con curvatura); por ello, el tipo de diseño utilizado y el método de optimización se clasifican, según sea el caso, como de primero o segundo orden.
3. La optimización es la técnica matemática que sirve para extraer la información sobre el punto óptimo que tiene el modelo ajustado.

En el anexo 18 se presenta un esquema de la metodología de superficie de respuesta.

Los diseños de primer orden son para ajustar modelos en los que sólo son importantes los efectos principales y no existen efectos de interacción. Entre los más utilizados se encuentran (Gutiérrez & De la Vara, 2012):

Diseños factoriales 2^k : diseño que estudia k factores con 2 niveles cada uno, y donde se corren los 2^k posibles tratamientos. Son útiles cuando $2 \leq k \leq 5$.

Diseños factoriales fraccionados $2^k = D$: diseños en los que se elige adecuadamente una parte o fracción de los tratamientos de un factorial completo, con la intención de estudiar el efecto de los factores utilizando menos corridas experimentales.

Diseño de Plackett -Burman: este diseño representa otra alternativa para fraccionar factoriales completos 2^k , donde el número de puntos de diseño no necesariamente es potencia de dos, pero si múltiplo de cuatro.

Diseño simplex: arreglo que se utiliza cuando se tienen muchos factores o bien cuando se quiere minimizar el costo de la investigación.

Los diseños de segundo orden permiten estudiar efectos lineales, de interacción y efectos cuadráticos o de curvatura pura. Entre los más utilizados se encuentran (Gutiérrez & De la Vara, 2012):

Diseño de Box -Behnken: diseño de segundo orden par a tres o más factores. No incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental.

Diseño Central Compuesto o de Composición Central (DCC): se emplea en la etapa de búsqueda de segundo orden. Se puede construir a partir de un diseño factorial 2^k agregando puntos sobre los ejes y al centro del diseño.

Diseños factoriales 3^k : modelo que considera k factores con tres niveles cada uno y tiene 3^k tratamientos. No son los más recomendados porque requieren más corridas experimentales.

Los modelos que se utilizan en la MSR son básicamente polinomios de primer y segundo orden como los mostrados en el anexo 19. La forma específica que toma la superficie depende de los signos y magnitudes de los coeficientes en el modelo. En el anexo 20 se representan las tres formas básicas.

La técnica de optimización a utilizar depende del tipo de modelo ajustado y existen básicamente tres métodos el primero para el modelo de primer orden y los otros dos para modelos de segundo orden (Gutiérrez & De la Vara, 2012):

1. Escalamiento ascendente: para el modelo de primer orden, sirve para determinar tratamientos por experimentar que están ubicados sobre la dirección de ascenso máximo a partir del centro del diseño inicial.
2. Análisis canónico: empleado para caracterizar la superficie de segundo orden, las coordenadas del punto estacionario, el tipo de punto y la orientación de la superficie.
3. Análisis de cordillera: se emplea para determinar el mejor punto dentro de la región experimental.

Los diseños de superficie de respuesta se clasifican con base en el grado del modelo que se pretende utilizar. Estos diseños proporcionan los tratamientos a correr para generar datos que permitan ajustar un modelo que describa una variable de respuesta en una región experimental (Montgomery, 2017).

1.6.1.1 Diseño de Box -Behnken.

El diseño Box -Behnken es una técnica multivariable de segundo orden que se basa en diseños factoriales incompletos, y que han recibido una amplia aplicación para la evaluación de diversas condiciones experimentales críticas, tales como una función de respuesta máxima o mínima. El número de experimentos o corridas (N) necesarios para el desarrollo del diseño experimental de Box-Behnken según Narciso y Paucar (2019) se define en la ecuación 1:

Ecuación 1: ecuación para determinar el número de corridas experimentales. Fuente: (Narciso & Paucar, 2019)

Donde (k) es el número del factor y (C₀) es el número replicado del punto central. En el anexo 21 se muestran los 15 tratamientos del diseño Box -Behnken para tres factores y tres puntos centrales.

Este diseño se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suele ser eficiente en cuanto al número de corridas. Es un diseño esférico y giratorio, rotable o casi rotable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental como el (1, 1, 1) y el (-1, -1, -1), que en algunas situaciones experimentales resultan extremos y no se pueden correr, por lo que este diseño solo debe usarse si no se tiene interés en predecir las respuestas en las esquinas de la región cuboidal. Esto puede ser ventajoso cuando los puntos de las esquinas del cubo representan combinaciones factor – nivel que son prohibitivamente costosas o imposibles de probar debido a restricciones físicas del proceso (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

En el anexo 22 se muestra geoméricamente lo mencionado anteriormente, los puntos de este diseño ubicados en medio de las aristas del cubo centrado en el origen sin incluir los tratamientos en los vértices.

El diseño de Box -Behnken es una buena alternativa porque tiene menor cantidad de puntos o corridas experimentales que el DCC, por esta causa el uso de este resulta menos costoso que la realización de los DCC para un mismo número de factores, además de que por su construcción los puntos de prueba no son extremos, en el sentido de que cualquiera de ellos siempre tiene, al menos uno de los factores en su nivel intermedio (Gutiérrez & De la Vara, 2012). También, a su vez puede ser de utilidad si se conoce la región de trabajo segura del proceso a estudiar, mientras que los DCC usualmente tienen puntos axiales fuera de la región de trabajo segura, pero dichos puntos pudieran no ser de la región de interés, o ser imposible su realización debido a que se ubican fuera de los límites de una operación segura (Narciso & Paucar, 2019).

1.6.1.2 Aplicaciones de la MSR en la biorremediación.

Por todo lo argumentado, la MSR se ha aplicado en la investigación científica; así como en la optimización de procesos químicos, físicos y biológicos.

Martínez et al. (2015) utilizaron la MSR al aplicar el diseño de segundo orden de Composición Central para optimizar la proporción de 2 factores: nitrógeno y potasio en la biorremediación de hidrocarburos, estas variables fueron analizadas en tres niveles, tomaron como variable de respuesta el porcentaje de remoción de hidrocarburos. En el análisis se incluyeron cuatro puntos centrales realizando así 12 corridas experimentales.

Shuo et al. (2019) utilizaron la MSR por medio del diseño de Box -Behnken para optimizar las variables de operación: temperatura, pH y concentración inicial de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), las cuales influyen en la degradación microbiana de los HTP.

Alcalde (2018) determinó la influencia de las sales inorgánicas en la optimización de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 empleando este diseño de segundo orden y obteniendo como resultado que la aplicación del mismo es muy eficaz para determinar las condiciones óptimas de bioprocesos.

1.7 Conclusiones parciales.

1. El manejo de residuos petrolizados constituye una problemática de alcance nacional. La contaminación con hidrocarburos puede provocar una amplia variedad de impactos en el

medio ambiente y en la salud. Es una prioridad la investigación, desarrollo e innovación en tecnologías dirigidas a la biorremediación de hidrocarburos.

2. La biorremediación es un método de tratamiento apropiado para la degradación de hidrocarburos. La biopila es una tecnología ex situ, que es pertinente para la biorremediación de residuos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos, mediante la bioestimulación.
3. Entre los factores o variables de operación más investigados para mejorar la eficacia de la ecotecnología de la biopila están: concentración de hidrocarburos, porcentaje de texturizante, porcentaje de humedad, y relación C:N:P:K . Aún existen nichos de conocimientos sobre este objeto de investigación.
4. La Metodología de Superficie de Respuesta es una estrategia experimental y de análisis que permite encontrar las mejores condiciones de operación de un proceso. El diseño de Box-Behnken es una buena alternativa económica porque requiere un mínimo de corridas experimentales a la hora de estudiar tres o más factores en tres niveles. Debido a esto es muy utilizado en las investigaciones sobre biorremediación de hidrocarburo.

Capítulo 2

Capítulo 2: Materiales y Métodos.

En este capítulo se desarrolló el segundo objetivo específico de la investigación. Se construyó un diagrama heurístico (figura 4), donde se muestra el procedimiento metodológico que se siguió para la evaluación de la influencia de las variables de operación seleccionadas de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados, a escala de banco.

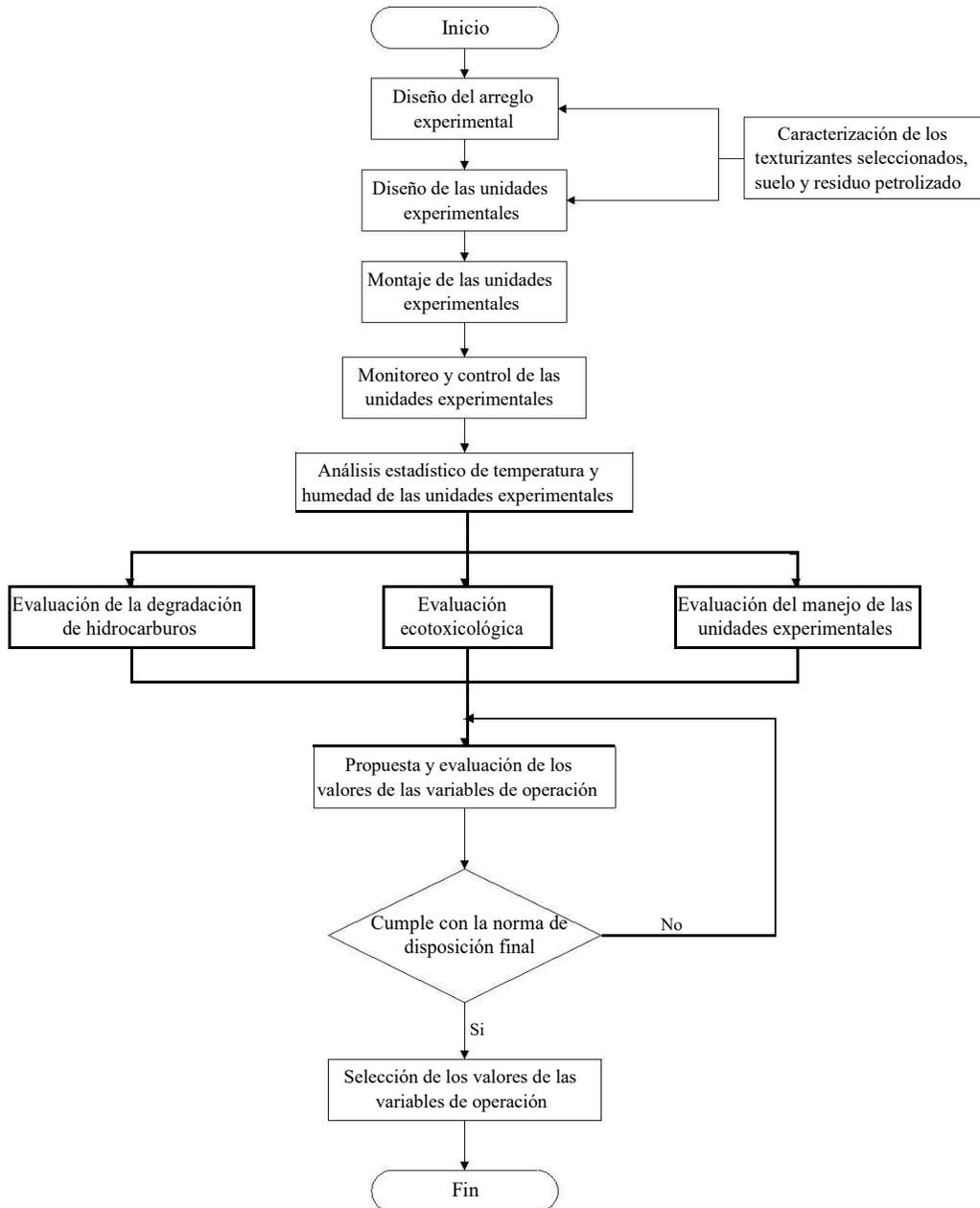


Figura 4: Diagrama heurístico para el protocolo experimental. Fuente: Elaboración propia.

Se usaron varias herramientas ingenieriles bajo el principio de la convergencia metodológica, que se consideran complementarias y no antagónicas. En particular el diseño de experimentos, balance de masa, diseño ingeniero y análisis estadístico. Además, se emplearon softwares profesionales y se desarrollaron libros de cálculo Excel.

El polígono experimental se estableció en la Unidad Científica Tecnológica de Base (UCTB) de Suelos de Barajagua, municipio Cumanayagua, perteneciente al Instituto Investigaciones de Suelos (IIS).

Seguidamente se describen los protocolos experimentales utilizados en cada paso.

2.1 Caracterización de los materiales (suelo, residuo petrolizado y texturizantes).

2.1.1 Elección, acopio y caracterización del suelo.

Se utilizó un suelo característico de la región central de Cuba, de bajo potencial agrícola, acopiado en las áreas aledañas al polígono experimental.

Se realizó la caracterización geotécnica del suelo en la Empresa Nacional de Investigaciones Aplicadas (ENIA) con el objetivo de determinar las propiedades físicas y clasificar el suelo. Los ensayos realizados fueron: granulometría e hidrómetro según ONN (1999a), límites de plasticidad según ONN (2000c), y peso específico relativo de los sólidos según ONN (1999b). Se clasificó el suelo según las normas cubanas de clasificación de suelos vigentes (ONN, 2000a, 2000b).

Se realizó caracterización física y química para determinar la densidad aparente, composición de nitrógeno (N), fósforo (P), pH y metales pesados. Los métodos utilizados fueron: densidad aparente (Flores & Alcalá, 2010); nitrógeno (CEAC, 2018b); fósforo (ONN, 2015b); pH (ONN, 2015a); y metales pesados (CEAC, 2018a).

2.1.2 Elección, acopio y caracterización del residuo petrolizado.

Se utilizó un residuo petrolizado proveniente del fondo del sedimentador de balance T-121/18 - 2, equipo tecnológico de la segunda sección de la planta de tratamiento de residuales de la Refinería de Petróleo de Cienfuegos.

Se realizó la caracterización física y química para determinar la densidad aparente, Grasas y Aceites (GyA) e Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP). Los métodos utilizados fueron:

densidad aparente (Flores & Alcalá, 2010); Grasas y Aceites (CEAC, 2017a); e Hidrocarburos Totales del Petróleo (CEAC, 2017b).

2.1.3 Elección, acopio y caracterización de los materiales texturizantes.

González (2019) realizó una primera fase experimental para la evaluación de la eficacia de la ecotecnología de biopilas para la biorremediación de residuos petrolizados objetos de la investigación, a escala de banco utilizando seis tipos de texturizantes: bagazo, cachaza, serrín, pulpa de café, estiércol vacuno, y residuos de *Thalassia testudinum*. Concluyó que el estiércol vacuno y el bagazo de caña integral resultaron ser los candidatos más idóneos, entre los seis texturizantes evaluados. El primero debido a su mayor porcentaje de remoción de hidrocarburos y el segundo por su capacidad de retención de humedad y comportamiento microbiológico. Propuso utilizar un texturizante combinado con un 75 % de estiércol vacuno y un 25 % de bagazo de caña integral, sustentado en el principio de Pareto y en experimentos previos sobre el manejo de las biopilas, así como la valoración cualitativa del laboreo con las mismas. Estos fueron los texturizantes utilizados en esta fase de la investigación.

El estiércol vacuno descompuesto y seco fue acopiado desde estercoleros de vaquerías pertenecientes a la Empresa Pecuaria El Tablón de Cumanayagua. El bagazo de caña fue acopiado de la nave de bagazo de la UEB Empresa Azucarera 14 de Julio de Rodas. Ambos texturizantes fueron trasladados desde sus fuentes de procedencia hasta el polígono experimental.

Se realizó caracterización física y química para determinar la densidad aparente, composición de carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y pH. Los métodos utilizados fueron: densidad aparente (Flores & Alcalá, 2010) y carbono, nitrógeno y pH (UCTB, 2017c).

2.2 Diseño de experimentos.

Muchas estrategias de optimización y de mejora continua, y en particular el diseño de experimentos, embonan en el llamado *ciclo de Deming*. Este representa una estrategia a seguir para mejorar continuamente cada producto o proceso, y consiste en los cuatro pasos: planear, hacer, verificar o estudiar y actuar, que se representan en el anexo 23.

Para la planeación y realización del diseño de experimento se siguieron los pasos recomendados por Gutiérrez y De la Vara (2012) los cuales se tratan a continuación.

Planeación y diseño:

1. *Definir el problema o el objeto:* el objeto de estudio fue evaluar la influencia de las variables de operación de la ecotecnología de biopilas sobre la biorremediación de residuos petrolizados, para mejorar la eficacia de la biorremediación en dicha tecnología.
2. *Elegir las variables de respuestas que será n medidas en cada punto del diseño y verificar que se miden de manera confiable:* las variables de respuesta tomada en consideración en el diseño fue la masa de HTP removida y concentración de HTP final. Esta variable fue medida como se explica en los epígrafes 2.5 y 2.7.1.
3. *Determinar cuáles factores deben estudiarse o investigarse, de acuerdo a la supuesta influencia que tienen sobre la respuesta:* Los factores o variables independientes involucradas en la ecotecnología de biopilas pueden ser controlables o no controlables.

Los factores que se controlaron en dicha investigación fueron (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003):

- Tipo de suelo (más abundante en la provincia de Cienfuegos).
- Residual petrolizado (se seleccionó un residual típico de la Refinería de Petróleo de Cienfuegos).
- Concentración de hidrocarburos en las unidades experimentales (HTP).
- % de texturizante en los tratamientos.
- Relación de nutrientes C:N:P:K en las unidades experimentales (adición de enmiendas).
- Método de aireación.
- Método de homogenización y confección.
- Método de humectación.
- % de humedad.
- Contenido de metales pesados.
- Forma y dimensiones de las unidades experimentales.

Los factores o variables no controlables fueron:

- Variables ambientales (se mantuvieron aleatorias y se monitorearon, aunque se mantuvo el experimento en un sistema cerrado, o sea protegido de lluvias, radiaciones solares directas, y fuertes vientos).

- Temperatura de las unidades experimentales (monitoreada).
- pH de las unidades experimentales no se pudo monitorear por carencia del equipamiento necesario. No obstante, en la investigación precedente (Casals, Rabassa, Viera, Gutiérrez, & Castro, 2020) el pH se mantuvo en el rango entre 6-8.

Como se apuntó en la conclusión parcial número 3 del Estado del Arte, entre los factores o variables de operación más investigados para mejorar la eficacia de la ecotecnología de la biopila están: concentración de hidrocarburos, porciento de texturizante, porciento de humedad, y relación C:N:P:K.

Sobre la relación C:N:P:K se ha encontrado que la mayoría de la literatura científica específica para la biorremediación establecen la relación 100:10:1:0.1 (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017). Por esta razón no se consideró esta variable entre los factores estudiados en el diseño experimental.

Los factores estudiados en el experimento fueron: concentración de HTP inicial, % de texturizante, y % de humedad en cada unidad experimental (biopila).

4. *Seleccionar los niveles de cada factor:* la biorremediación es un bioproceso muy complejo (Shuo et al., 2019) donde es importante estudiar además de los efectos lineales y de interacción entre las variables, los efectos cuadráticos o de curvatura pura. Lo anterior requiere de al menos tres niveles en cada factor para estimar la curvatura de la superficie en la dirección de cada factor (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

En la tabla 1 se muestran los niveles de los factores estudiados. Estos fueron seleccionados basados en las recomendaciones establecidas en la literatura científica sobre la ecotecnología de biopilas (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003). En este contexto, González (2019) en la fase anterior de la investigación utilizó niveles de 11 000 mg/kg de HTP, 8 % de texturizantes y 20 % de humedad.

Tabla 1: Niveles de los factores estudiados. Fuente: Elaboración propia.

Factores / Niveles	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Concentración de HTP inicial (mg/kg)	22 000	30 500	39 000
% de texturizante	4	8	12
% de Humedad	20	25	30

5. *Seleccionar el diseño experimental adecuado a los factores que se tienen y al objetivo del experimento:* Para cumplir los objetivos de la investigación, después de una primera etapa experimental, es necesario desplazar la región experimental en una dirección adecuada, o bien, explorar en forma más detallada la región experimental inicial. La forma de realizar ambas cosas es parte de la llamada Metodología de Superficie y Respuesta (MSR). Asimismo, los requisitos de los niveles seleccionados para cada factor exigen utilizar un modelo de segundo orden.

El costo, la dificultad o el tiempo consumido con cierto tipo de experimentos pueden obligar a reducir el tamaño del experimento, pero tal reducción está limitada por el modelo estadístico que estima la superficie de respuesta.

El diseño de Box -Behnken es una buena alternativa económica para la optimización de procesos de biorremediación, donde se requieran al menos tres o más factores, porque tiene un número mínimo de tratamientos, además de que por su construcción los puntos de prueba siempre tienen, al menos uno de los factores en su nivel intermedio. También, es flexible y tiene buenas propiedades como ortogonalidad, rotabilidad y/o precisión uniforme, las cuales tienen que ver con la calidad de estimación del modelo (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Se creó un diseño de Box -Behnken para estudiar los efectos de los 3 factores en 15 corridas (tratamientos). El diseño fue ejecutado en un solo bloque. El orden de los experimentos fue completamente aleatorizado, lo que aportó protección contra el efecto de variables ocultas. Se utilizó el software Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

6. *Planear y organizar el trabajo experimental:* se diseñó una hoja de trabajo con las especificaciones claras de cada tratamiento, el orden en que fueron realizados y la forma en que colectaron los datos y se midieron los resultados. Se definieron los participantes y responsables de cada actividad (equipo de trabajo del CEAC, ICIMAR y UCTB) y las instrucciones generales y específicas que se siguieron. Se aseguraron todos los detalles de la logística requerida y del cronograma de trabajo.
7. *Realizar el experimento:* Se procedió según el plan de diseño en el punto anterior.

2.3 Diseño ingeniero de las unidades experimentales.

Se consideraron principios y criterios de diseño establecidos en el estado del arte (Abdul & Webb, 2017; BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017; Wu & Coulon, 2015) tales como:

1. Escala de la investigación y principios de escalado.
2. Aplicabilidad de los principios básicos de diseño del compostaje tradicional.
3. Tipo de texturizantes, acondicionantes y/o mejoradores.
4. Características de los sistemas de compostaje aeróbicos.
5. Morfología de biopilas con una geometría de pirámide truncada.
6. El ángulo de reposo o inclinación de la masa de la biopila.
7. Alturas de las unidades experimentales utilizadas a escala de banco.
8. Sistema cerrado o abierto.

Para el diseño de las unidades experimentales en esta investigación se tuvieron en cuentas los siguientes aspectos:

1. Requerimientos del arreglo experimental, según resultados del diseño de experimentos.
2. Sistema cerrado para el polígono experimental, para lo cual se adaptó una nave con piso de hormigón, cubierta de fibrocemento y ventanal para ventilación. La puerta está enrejada para limitar los accesos y a la vez favorecer la ventilación. Las dimensiones del polígono experimental fueron 14,35 m x 5,70 m.
3. Las dimensiones de las bandejas de polietileno para el montaje de una unidad experimental fueron de 1,10 m x 0,95 m.
4. Caracterización física y química de los materiales componentes de la biopila.
5. Peso o masa total seca de muestra destructiva requerida para los ensayos físico-químicos y ecotoxicológicos durante la ejecución del experimento.
6. Relación peso o masa total inicial / peso o masa total final de la unidad experimental.
7. La geometría de la unidad experimental se asumió como una pirámide truncada, con ángulo de 45° y altura de 20,00 cm.

Se implementó el protocolo de diseño ingeniero programado en un libro de cálculo de Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016). Incluyó el balance de masa a nivel de cada unidad

experimental para determinar el peso de cada componente de la biopila y posteriormente determinar las dimensiones de las mismas. Incluyó:

1. Determinación del peso o masa total inicial seca de la unidad experimental.
2. Determinación del peso o masa total de residuo petrolizado en la unidad experimental seca, a partir de las concentraciones de las fracciones de HTP obtenidas en la caracterización del residual y de los requerimientos de experimentación prefijados para las condiciones iniciales.
3. Definición del por ciento peso o masa de los agentes de volumen o texturizantes en la unidad experimental seca.
4. Determinación del peso o masa total de suelo en la unidad experimental seca.
5. Determinación del volumen inicial de los componentes y de la unidad experimental seca.
6. Determinación de las dimensiones del largo y ancho de la base, que satisfagan los requerimientos establecidos para el diseño. Se asumió una relación longitud / ancho de la base inferior igual 1,50. Se programó un procedimiento de cálculo iterativo mediante la ecuación de volumen del cuerpo geométrico para verificar que la altura calculada fuera igual a la altura de diseño mediante la ecuación 2.

$$V = \frac{h}{3} (A_1 + A_2 + \sqrt{A_1 A_2}) \quad (2)$$

Ecuación 2: Ecuación del volumen de una pirámide truncada. Fuente: (Polyanin & Manzhirov, 2007).

Donde:

V: volumen de una pirámide truncada (cm³).

A: área de la base mayor (cm²).

A_b: área de la base menor (cm²).

h: altura (cm).

7. Determinación del peso o masa total de las enmiendas de nutrientes necesarios en solución acuosa según las proporciones requeridas de C:N:P:K (100:10:1:0,1) y porcentaje de humedad, según la literatura (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017;

Snelgrove, 2010; Velasco & Volke, 2003).

Se utilizó un procedimiento aleatorio simple para intercalar cada una de las unidades experimentales correspondientes a los tratamientos y sus réplicas. Posteriormente, se asignaron números consecutivos para la distribución en planta de las unidades experimentales aplicando un patrón de S.

2.4 Montaje de las unidades experimentales.

2.4.1 Estabilización del sistema suelo -residuo petrolizado.

El residuo petrolizado acopiado se depositó en bandejas y se procedió al desmenuce manual de los grumos. Posteriormente el residuo petrolizado se introdujo en dos partes en un tanque tapado de manera segura, el que se colocó horizontalmente y se hizo rodar como tambor, para homogenizar contenido en el interior del tanque.

Por su parte, el suelo previamente tamizado, se descompactó y homogenizó con medios manuales como guatacas y palas.

Posteriormente se procedió al pesaje de los componentes de la mezcla para la estabilización (suelo-residuo petrolizado) en correspondencia con lo diseñado para cada unidad experimental. Luego fueron acarreados hasta el polígono experimental y mezclados con métodos manuales mediante un vagón de construcción y guatacas. Se procedió a mezclar hasta lograr que la textura de la mezcla fuera homogénea haciéndose una valoración visual del color (parejo en toda la masa) y ausencia de grumos en la mezcla. Una vez homogenizada la mezcla se introdujo dentro de bolsas de polietileno de 25,00 x 30,00 cm, se cerraron las mismas y se depositaron en bandejas de polietileno. Se mantuvo tapado 5 días para la estabilización del sistema (Flores, 2015; Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004).

2.4.2 Conformado de las unidades experimentales.

Transcurrido el período de estabilización se procedió a destapar las bolsas y añadir al sistema residuo petrolizado-suelo la cantidad de texturizante requerida según el diseño. La homogenización de esta mezcla se logró en condiciones análogas a la anterior. Una vez lograda la nueva mezcla se volteó el vagón en las bandejas de polietileno, que previamente se había cubierto con bolsas de polietileno. La mezcla final de todos los componentes fue homogenizada.

Posteriormente se le tomó a cada unidad experimental una muestra para la determinación del % de humedad en la unidad experimental seca, por el método gravimétrico según la ONN (2011).

A partir de este resultado, por balance de masa, se determinó el peso de agua a añadir para lograr el % de humedad final requerida (según el nivel de la variable en el tratamiento).

Análogamente, se implementó un libro de cálculo de Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016) para determinar la masa de enmiendas necesarias. Se tuvieron en cuenta los criterios de la literatura científica (BATTELLE & NFESC, 1996; Román et al., 2013):

1. Se define la relación de C:N:P:K de acuerdo a lo recomendado en la literatura científica (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003).
2. Se calcula la masa de carbono orgánico contenido en cada unidad experimental, teniendo en cuenta el carbono aportado por el residuo petrolizado y el texturizante.

$$\text{El carbono aportado por el residuo petrolizado se calculó por la ecuación 3: } \frac{(\text{HC} \cdot \text{GyA}(t=0) \cdot 0,8)}{1000} \quad (3)$$

Ecuación 3: Ecuación para el cálculo de la masa de carbono aportada por el residuo petrolizado. Fuente: (BATTELLE & NFESC, 1996).

Donde:

HC: masa del residuo petrolizado en la unidad experimental (kg).

GyA (t = 0): concentración de grasas y aceites en el residual petrolizado en (mg/kg).

CR: masa de carbono aportado por el residual petrolizado (g).

El carbono aportado por el texturizante se calculó mediante la ecuación 4:

(4)

Ecuación 4: Ecuación para el cálculo de la masa de carbono aportada por el texturizante. Fuente: Elaboración propia.

Donde:

M_b: masa del bagazo (g).

C_{mb}: % de carbono en el bagazo utilizado.

M_e : masa de estiércol vacuno (g).

C_{me} : % de carbono en el estiércol utilizado.

CT: masa de carbono aportado por el texturizante (g).

Luego se sumó la cantidad de carbono aportado por el residuo petrolizado y el texturizante ecuaciones 3 y 4 respectivamente obteniendo el total de carbono presente en cada tratamiento.

3. De forma análoga a la ecuación 4 se calcularon las masas de nitrógeno y fósforo aportada el texturizantes compuesto por bagazo y estiércol vacuno, teniendo en cuenta la masa y el aporte de nitrógeno y fósforo según la caracterización físico - química de los mismos para cada tratamiento. El potasio aportado por el texturizante resultó ser muy bajo por lo que se consideró despreciable.
4. Se determinó la cantidad de nitrógeno, fósforo y potasio que se debían añadir por medio de enmiendas a cada tratamiento para alcanzar la relación C:N:P:K definida en el paso 1.
5. Se calcularon las masas necesarias a adicionar por cada una de las fuentes de fertilizantes utilizadas: nitrato de amonio, superfosfato simple y cloruro de potasio como fuentes de N, P y K respectivamente. En la tabla 2 se expresa la composición de las enmiendas utilizadas.

Tabla 2: Contenido de nutrientes primarios (N, P y K) en los fertilizantes empleados expresados en porcentajes de nitrógeno (N), óxido de potasio (P_2O_5) y óxido de potasio (K_2O). Fuente: (Román et al., 2013).

Fuentes de Fertilizantes	Forma Molecular	Contenido de N (%)	Contenido de P_2O_5 (%)	Contenido de K_2O (%)
Nitrato de Amonio	$NH_4(NO_3)$	34	-	-
Superfosfato Simple	$Ca(H_2PO_4)_2$	-	20	-
Cloruro de Potasio	KCl	-	-	60

Para calcular la cantidad de P y K en su forma simple se multiplicaron sus óxidos por los pesos moleculares de sus óxidos, 0,44 para obtener el P y 0,83 para obtener el K.

Una vez conformada las unidades experimentales se añadieron las enmiendas en solución acuosa en correspondencia con las proporciones requeridas de C: N: P: K (100:10:1:0,1) y porcentaje de humedad.

Se realizó el conformado de las unidades experimentales en correspondencia con las propuestas de diseño para cada tratamiento. Además, se construyeron y utilizaron plantillas para la estandarización de las relaciones entre las dimensiones de la base, altura y ángulo de reposo de cada tratamiento.

2.5 Monitoreo de las unidades experimentales.

Las biopilas durante el período de experimentación fueron monitoreadas y controladas, según las siguientes actividades y tiempos:

1. Homogenización y aireación (cada 15 días): se homogenizó y aireo manualmente el contenido de cada unidad experimental en su propia bandeja.
2. Conformado (cada 15 días): una vez homogenizado y aireado se volvió a conformar la unidad experimental utilizando las plantillas creadas para la estandarización de las relaciones entre las dimensiones de la base, altura y ángulo de reposo de cada tratamiento.
3. Humectación (cada 4 días): a partir del % de humedad real de la unidad experimental, por balance de masa, se determinó el peso de agua a añadir para lograr el % de humedad final real requerido, según el nivel de la variable en el tratamiento. El agua se añadió con una regadera distribuyéndola uniformemente sobre todo el volumen de la unidad experimental.
4. Monitoreo de temperatura y humedad (cada 7 días): se realizó el monitoreo de la temperatura (T) y humedad (H), el cual fue registrado en una hoja de chequeo elaborada en Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016) como se muestra en el anexo 24.

La temperatura fue medida con un termómetro de escala de 0 - 50 °C con un error de estimación de $\pm 0,1$ °C, marca Silber Brand, en el centro de la biopila, cuidando que el orificio de introducción del termómetro no tuviese un diámetro muy ancho para que no se disipara la temperatura. El valor de la temperatura fue tomado aproximadamente 10 minutos después de haber introducido el termómetro para garantizar la estabilización de la medición.

Para el monitoreo de la humedad se tomaron pequeñas submuestras de profundidad y superficie alternando en 5 puntos dispuestos en las diagonales que se correspondan, cuatro de ellos en las esquinas y uno en el centro de los tratamientos. A partir de estas

submuestras se conformó una muestra compuesta homogenizando bien las porciones de material tomadas y realizando un cuarteo para la selección de 3 g para el análisis del porcentaje de humedad por el método gravimétrico según ONN (2011).

Se estableció para el monitoreo del factor % de humedad un intervalo del valor deseado ± 2 unidades; teniendo en cuenta los resultados de la investigación precedente (Casals et al., 2020; González, 2019) donde se demostró que para las condiciones de esta investigación, el factor % de humedad de la unidad experimental tuvo este comportamiento atribuido a que el control de la misma se efectuó de forma manual y a la propia incertidumbre del método de ensayo, entendida como el parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos a la magnitud a medir (ONN, 2008).

5. Monitoreo físico-químico (tiempo 0, 50, 100 y 240 días): análogamente al muestreo para el monitoreo de la humedad se muestreó el contenido de cada unidad experimental para la determinación de la concentración de HTP. Esta se realizó según procedimientos de CEAC (2017b) y CEINPET (2020).
6. Monitoreo ecotoxicológico (tiempo 240 días): análogamente a los muestreos anteriores se muestreó el contenido de cada unidad experimental para los ensayos ecotoxicológicos. Los bioensayos se realizaron utilizando los protocolos propuestos por Valle (2018a) y Valle (2018b); y se detallan en el epígrafe 2.8.
7. Monitoreo de las variables climáticas: se registraron datos semanales y mensuales correspondientes a las variables de temperatura media ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa media (%), precipitación (mm) y viento medio (km/h) desde marzo hasta noviembre de 2019. Dichos datos fueron obtenidos a través de un certificado emitido por el Centro Meteorológico Provincial de Villa Clara, Cuba (INSMET, 2020).

Las mediciones fueron tomadas de los archivos de la estación meteorológica “La Piedra” ubicada en Carretera a Jibacoa, km 4, Manicaragua, Villa Clara, con coordenadas de Latitud de $22,00^{\circ} 11,00'$ N y Longitud de $79,00^{\circ} 98,00'$ W, su identificación en la red climatológica es 78308. Dicha estación se encuentra a 14 km del polígono experimental y es un lugar con características físicas, geográficas y climáticas

similares a este. En la figura 5 se muestra una imagen satelital con la ubicación de ambas instalaciones.

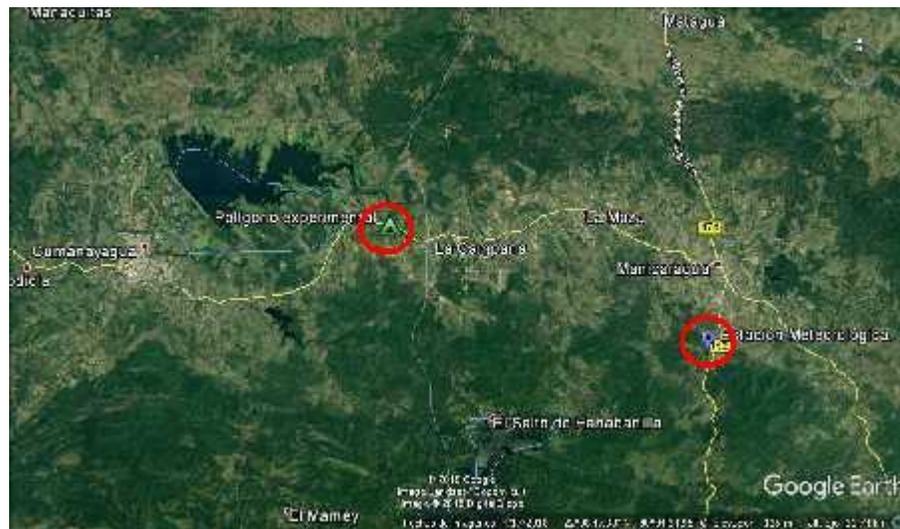


Figura 5: Imagen satelital con ubicación del polígono experimental y estación meteorológica “La Piedra”. Fuente: Imagen modificada de Google Earth.

2.6 Análisis estadísticos de los datos de temperatura y humedad de las unidades experimentales.

Se evaluó el comportamiento de los factores abióticos (temperatura y humedad de cada unidad experimental) durante el período de ejecución del experimento. Los datos fueron procesados estadísticamente utilizando el software Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para cada variable de análisis con el objetivo de determinar las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Se realizaron análisis para la identificación de datos aberrantes aplicando la Prueba de Grubbs. Se realizaron comparación de varias muestras y la prueba de hipótesis comparación de múltiples rangos, así como Gráficas de Individuos para corroborar que los datos del monitoreo de la humedad de los tratamientos se encontraban en el rango deseado. Además, se utilizaron pruebas gráficas y tabulares para verificar el cumplimiento de supuestos subyacentes al análisis de varianza.

Para evaluar la incidencia de las variables climáticas sobre el comportamiento de los factores abióticos se aplicó el procedimiento de análisis multivariado utilizando el software 52

Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010) para verificar la relación de las variables temperatura y humedad de las unidades experimentales, con las variables climáticas analizadas y en función de los resultados se realizaron análisis de regresión.

2.7 Evaluación de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).

2.7.1 Análisis de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).

Se promediaron los resultados obtenidos, por CEAC y el Centro de Investigaciones del Petróleo (CEINPET), del monitoreo de las concentraciones de HTP en cada unidad experimental para el tiempo final de 240 días.

Se determinó la masa de HTP removida en cada unidad experimental, utilizando la ecuación 5, a partir de la concentración de HTP a los 0 días y los valores medios obtenidos para 240 días.

Ecuación 5: Ecuación para el cálculo de la masa de HTP removida en cada unidad experimental. Fuente: Elaboración propia.

Donde:

MR: masa de HTP removida en la unidad experimental (kg).

HTP_{t=0}: concentración de HTP en la unidad experimental en el tiempo 0 días (mg/kg).

HTP_{t=240}: media entre los resultados de CEAC y CEINPET de las concentraciones de HTP en la unidad experimental en el tiempo 240 días (mg/kg).

M_{bi}: masa total inicial de la unidad experimental (kg).

Asimismo, se determinó el porcentaje de remoción utilizando la ecuación 6:

$$\%R = \left(\frac{HTP_t}{HTP_{t=0}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Ecuación 6: Ecuación para el cálculo del porcentaje de remoción de HTP en cada unidad experimental. Fuente: Elaboración propia.

Donde:

% R: % de remoción de HTP en la unidad experimental.

$HTP_{t=0}$: concentración de HTP en la unidad experimental en el tiempo 0 días (mg/kg).

$HTP_{t=240}$: media entre los resultados de CEAC y CEINPET de las concentraciones de HTP en la unidad experimental en el tiempo 240 días (mg/kg).

Se implementó un libro de cálculo de Microsoft Office Excel para los cálculos y gráficos necesarios (Microsoft, 2016).

2.7.2 Análisis e interpretación de los resultados del diseño experimental.

Teniendo en cuenta que en el diseño experimental se consideraron dos variables de respuesta fue necesario encontrar la combinación de los factores estudiados donde ambas respuestas tomaron valores aceptables dentro del rango de experimentación. Para ello se requirió de una optimización simultánea para obtener una solución de compromiso u óptimo simultáneo, donde todas las variables tuvieron un nivel satisfactorio.

Para el análisis de cada una de las variables de respuesta se procedió de forma análoga según Gutiérrez y De la Vara (2012), y utilizando el Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se introdujeron los valores de los niveles de los factores estudiados y los resultados de las variables de respuesta para el tiempo final del experimento en una hoja de datos del diseño (Diseño de Box -Behnken) creado por el software.

Posteriormente se procedió a analizar el diseño experimental para las siguientes opciones de estimar efectos: máximo de 2 del orden de efecto y un intervalo de confianza del 95 %.

Luego se procedió a realizar las pruebas tabulares (Resumen del análisis de experimento, ANOVA, Matriz de Correlación y Coeficientes de Regresión) y las pruebas gráficas (Diagrama de Pareto, Gráfico de Efectos Principales, Gráfica de Interacción y Gráficos de Respuestas) de los análisis estadísticos implementados por el software.

Se analizaron las propiedades ortogonalidad y rotabilidad, las cuales las cuales tienen que ver con la calidad de estimación del modelo. Se considera que un diseño es ortogonal cuando los coeficientes estimados en el modelo ajustado no están correlacionados entre sí, lo cual

hace que el efecto de cada término, representado por el parámetro correspondiente, se estime de manera más precisa. Del mismo modo es rotatable cuando la varianza de la respuesta estimada sobre un punto depende de la distancia de éste al centro del diseño y no de la dirección en la que se encuentra.

A partir del análisis de varianza (ANOVA) y los coeficientes de regresión se obtuvo un modelo cuadrático que describió el proceso estudiado, por otra parte, la tabla de optimización arrojó los valores asignados a los factores estudiados para obtener el valor óptimo de la variable de respuesta. Asimismo, los gráficos obtenidos muestran el comportamiento de dicho modelo al variar los valores los factores estudiados en el rango establecido.

A partir de las pruebas de coeficientes individuales del modelo mostrado en el ANOVA se evaluó qué tanto contribuye cada término a la explicación de la variable de respuesta, para de esa forma valorar la eliminación de los que tienen una contribución poco importante. La aplicación del procedimiento anterior ayudó a depurar el modelo.

Se eligió el término que tuvo menor contribución o menos significativo. Se procedió a eliminar los términos de menor contribución del modelo, se ajustó un nuevo modelo y se compararon los cambios en el coeficiente de determinación (R^2 , el coeficiente) de determinación ajustado (R^2_{aj}) y la raíz cuadrada del cuadrado medio del error (para los dos modelos). Se evaluó siguiendo el mismo proceder hasta que sólo quedaron en el modelo términos significativos, o términos que al eliminarlos disminuía el ajuste del modelo. Este proceso continuó hasta que sólo quedaron en el modelo términos significativos.

Esta técnica se conoce como técnica de selección de variables por pasos hacia atrás, y se inició con un modelo que incluyó todos los términos, y paso a paso le quitó las variables que menos contribuyeron al ajuste. En resumen, se obtuvo un modelo depurado que incluyó sólo términos que realmente ayudaron a explicar la variable de respuesta.

En el análisis anterior, teniendo en cuenta que en superficie de respuesta se prefieren los modelos jerárquicos, este criterio fue considerado en la depuración del modelo. Un modelo de superficie de respuesta es jerárquico si contiene todos los términos más simples que componen los términos de mayor orden que están en el modelo. Esto implicó la eliminación de efectos o términos del modelo con el objetivo de encontrar una región n experimental que

arroje resultados favorables, además permitió que algunos términos no significativos permanecieran en el modelo para lograr la jerarquía.

Fue preciso verificar que cada modelo cumpliera los supuestos tradicionales de normalidad, varianza constante e independencia de los residuos, y que el coeficiente de determinación R^2_{aj} de cada modelo sea mayor que 70 %.

En la práctica se utilizaron las muestras de residuos para comprobar los supuestos del modelo, ya que, si los supuestos se cumplen, los residuos o residuales se pueden ver como una muestra aleatoria de una distribución normal con media cero y varianza constante. Los análisis y pruebas estadísticas fueron las siguientes:

1. Normalidad: se cumple si los residuos del modelo del diseño siguen una distribución normal. Para analizar dicho supuesto se realizó la prueba analítica de Shapiro – Wilks y gráficos de probabilidad normal.
2. Varianza constante: también conocido como homocedasticidad es el supuesto del ANOVA del diseño, que se cumple cuando todos los tratamientos presentan igualdad de varianza en sus errores de estimación. Para validar dicho supuesto se analizó el comportamiento del gráfico de predichos vs residuos.
3. Independencia: refiere que los residuos deben ser independientes unos de otros. Para analizar el cumplimiento de dicho supuesto, se realizó la prueba de Durbin – Watson y gráfica de orden de corrida vs residuos para comprobar el supuesto de independencia, así como otras pruebas de comprobación de supuestos.

Una vez que se obtuvieron los modelos debidamente ajustados y validados se procedió a explorar la superficie descrita por los mismos para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de las respuestas.

Se analizaron las condiciones de operación que arrojan mejores resultados de las dos variables de respuesta al mismo tiempo, cumpliendo con la concentración de HTP final establecida para la disposición final del residuo según la norma ONN (2017) de 10 000 mg/kg.

En este contexto se procedió a realizar una Optimización de Múltiples Respuestas para obtener una optimización simultánea y buscar una solución de compromiso donde todas las variables tengan un nivel satisfactorio.

Para la optimización simultánea se utilizó el método analítico basado en la función deseabilidad (Gutiérrez & De la Vara, 2012). Este método provee soluciones consistentes tanto con los datos observados en el experimento como con la información que se les provee. Asimismo, es intuitivo y flexible ya que permite balancear de diversas formas la importancia relativa de las respuestas.

El método de la función deseabilidad consiste, en definir una función en el espacio de factores que estimó la deseabilidad global del producto en cada punto, o sea la función de los factores estudiados que transformando los valores predichos por el modelo en una escala de 0 a 1 para indicar que tan deseables son. De esta forma convirtió el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado. Con solo maximizar la función deseabilidad se obtiene el punto óptimo buscado (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Para la aplicación de este método se utilizó el software Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010) utilizando la opción de Optimización de Múltiples Respuestas que permitió determinar los valores de los factores estudiados que cubrieran las características deseadas para ambas respuestas simultáneamente. Se construyó la función de deseabilidad, basada sobre los valores de las variables respuesta, la cual se maximizó.

Se buscaron los valores de los factores que maximizaron la masa de HTP removida, y mantuvieron una concentración de HTP final del orden de 8 000 mg/kg, para asegurar el intervalo de incertidumbre del método de ensayo y la propia del modelo ajustado. Asimismo, garantizar la economía de la ecotecnología.

El análisis e interpretación de los resultados del diseño permitió evaluar la influencia de las variables de operación sobre la biorremediación de HTP. No obstante, también fue necesario tener en cuenta criterios ecotoxicológicos y de manejo de las unidades experimentales.

2.8 Evaluación ecotoxicológica.

La toxicidad es el grado de efectividad de una sustancia tóxica en humanos, animales, plantas o microorganismos. Se evalúa mediante bioensayos que consisten en poner organismos vivos a sustancias tóxicas y registrar los efectos sobre los mismos. En este sentido es común que las pruebas de fitotoxicidad estén orientadas a la valoración de: la mortalidad (toxicidad aguda), el índice de germinación, la elongación radicular, el crecimiento de producción de biomasa, el contenido de clorofila y la tasa fotosintética entre otras (Fernández et al., 2006).

La evaluación ecotoxicológica constituye una excelente herramienta en la evaluación del riesgo ambiental. Representan una metodología ventajosa al brindar información acerca de alguna sustancia que resulte tóxica en el medio, es decir, algún agente que pueda producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función, o producir la muerte. En la práctica estos métodos no pueden reemplazarse por los análisis químicos (Pentreath, González, Barquín, Ríos, & Perales, 2015).

Es por esto que se evaluó la calidad ecotoxicológica del residuo final de cada tratamiento (240 días). Se realizaron dos bioensayos utilizando dos patrones de organismos: uno animal con *Eisenia foetida* Savigny y uno vegetal con *Lactuca sativa* Linneo. Los bioensayos se realizaron utilizando los protocolos propuestos por Valle (2018a) y Valle (2018b).

2.8.1 Patrón animal empleando *Eisenia foetida*.

Las lombrices son ampliamente reconocidas como biomodelo para evaluar la toxicidad de suelos contaminados, este organismo es un componente abundante y de gran valor dentro de los ecosistemas terrestres por lo que es considerado un bioindicador “in situ” o centinela de posibles daños al ecosistema. Tiene fácil recolección, manipulación y mantenimiento en una variedad de residuos orgánicos. La especie recomendada es *Eisenia foetida* que, aunque no es una típica lombriz de tierra se encuentra en suelos ricos en materia orgánica con una susceptibilidad a productos químicos similar a la de especies que habitan en el suelo. Es prolífica y tienen un ciclo de vida corto (8 semanas para alcanzar la madurez).

Se emplearon lombrices adultas (de más de 2 meses de edad) de la especie *Eisenia foetida* con un peso promedio de 300-600 mg procedentes del laboratorio de Sanidad Vegetal de Santa Clara de Villa Clara. Las lombrices a incluir en el ensayo se seleccionaron en función de su madurez, peso y morfología de esta forma se logró homogeneidad en el biomodelo.

A partir de la vista en planta y partiendo del diseño experimental se elaboró el diseño del estudio. Siguiendo la metodología de Valle (2018a) se tomó de cada tratamiento una muestra para cada ensayo con *Eisenia foetida* obteniéndose en total 15 ensayos, más 2 ensayo testigo.

Dichas lombrices se mantuvieron, al menos 7 días, antes del ensayo en un contenedor plástico con suelo pardo grisáceo, en las mismas condiciones y ambiente que durante el ensayo: temperatura controlada en un rango de 18 – 22 °C (fase de aclimatación), intensidad de iluminación de 400 a 800 lux. La alimentación fue a costa de estiércol de vacuno.

Antes de ser colocadas en los contenedores plásticos para iniciar el ensayo, las lombrices se depositaron por 24 horas en papel filtro humedecido con la finalidad de vaciar sus intestinos. Luego se lavaron con agua destilada, se secaron cuidadosamente con papel de filtro, se pesaron y seleccionaron según los criterios de selección descritos anteriormente y se distribuyeron aleatoriamente en conjuntos de 5 lombrices. Cada conjunto de 5 lombrices fue colocado en un contenedor plástico que contuvo la muestra.

El ensayo se extendió por 28 días. Las lombrices fueron observadas periódicamente durante el ensayo, las lombrices muertas fueron removidas y los datos recogidos. Las lombrices se consideraron muertas al no responder a ningún estímulo mecánico. Se registró cualquier síntoma patológico.

Para que la prueba sea considerada como válida, la mortalidad en el control no deberá exceder el 10 % al final del período de exposición, de resultar lo contrario se extiende el período de observación por 15 días más.

Se realizaron observaciones pertinentes tanto de las variables a medir como de las de respuestas, siendo las primeras: el registro diario de temperatura y humedad relativa del local de prueba. Las variables de respuestas fueron:

- Mortalidad.
- Signos de toxicidad (alteraciones fisiológicas y/o conductuales).
- Movimientos rápidos.
- Disminución del movimiento.
- Aspecto filiforme.
- Inflamación del clitelo.
- Ulceración del clitelo.
- Necrosis del clitelo.
- Abultamientos y constricciones del cuerpo.
- Consistencia blanduzca.
- Pérdida de líquido celómico.

Para los organismos se determinó el porcentaje de mortalidad.

2.8.2 Patrón vegetal empleando *Lactuca sativa*.

Los bioensayos con plantas se consideran, de manera creciente, para el diagnóstico ecotoxicológico. Dentro de las metodologías estandarizadas para establecer condiciones controladas la especie *Lactuca sativa* (lechuga) han sido recomendada por la US EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) y la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos) para ensayos de fitotoxicidad, encontrándose entre las especies más sensibles. Las plantas vasculares son recomendadas debido a su mayor sensibilidad, en comparación con otras especies (Valle, 2018b; Wang, 1991). Además que se considera un bioindicador estandarizado para evaluar toxicidad causada por hidrocarburos (Valle, 2018b).

Se siguió una metodología analoga al ensayo previamente mencionado con *Eisenia foetida*.

La obtención de semillas de lechuga *Lactuca sativa* se realizó en la Empresa Provincial de Semillas Varias de Villa Clara, certificadas por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Villa Clara con viabilidad probada mayor del 90 %, sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocótilo. Las semillas se agruparon por tamaño y morfología y se escogió el grupo más uniforme para su inclusión en el ensayo definitivo.

También se realizaron las observaciones pertinentes tanto de las variables a medir como de las de respuestas, siendo las primeras: El registro diario de temperatura y humedad relativa del local de prueba. Las variables de respuestas fueron:

1. Germinación.
2. Signos de toxicidad o efectos fitotóxicos (alteraciones fisiológicas).
3. Elongación de la raíz.

A fin de determinar la fitotoxicidad del suelo se obtuvo el IG (Índice de Germinación) (Valle, 2018b) como se observa en la ecuación 10, que integra el porcentaje relativo de germinación (PGR) y el crecimiento relativo de las raíces (CRR) mostrados en las ecuaciones 8 y 9 respectivamente:

SGM

$$\text{PGR} = \frac{\text{SGT}}{\text{ERM}} \cdot 100 \quad (8)$$

Ecuación 8: Cálculo del porcentaje relativo de germinación. Fuente: (Valle, 2018a).

Siendo:

PGR: porcentaje relativo de germinación.

SGM: número de semillas germinadas en la muestra.

SGT: número de semillas germinadas en el testigo. ERM

$$\text{CRR} = \frac{\text{ERT}}{\text{ERM}} \cdot 100 \quad (9)$$

Ecuación 9: Cálculo del crecimiento relativo de las raíces. Fuente: (Valle, 2018a).

Siendo:

CRR: crecimiento relativo de las raíces (cm).

ERM: elongación de radículas en la muestra (cm).

ERT: elongación de radículas en el testigo (cm). PGR x CRR

$$\text{IG} = \frac{\text{CRR}}{\text{PGR}} \cdot 100 \quad (10)$$

Ecuación 10: Cálculo del Índice de Germinación. Fuente: (Valle, 2018a).

Siendo:

IG: índice de Germinación (%).

PGR: porcentaje relativo de germinación.

CRR: crecimiento relativo de las raíces (cm).

Este índice resulta más consistente al abordar dos etapas que pueden manifestar diferente comportamiento frente al contaminante.

Los resultados obtenidos de IG se reunieron en tres categorías fitotóxicas: *severa*, *moderada* y *leve* (Valle, 2018b). En ellas se estableció el siguiente criterio de interpretación: severa, para valores de $\text{IG} \leq 50\%$ indicando fuerte presencia de sustancias fitotóxicas; moderada para valores entre 50 y 80 % y leve si el $\text{IG} \geq 80\%$, lo que indicó que no hay sustancias

fitotóxicas o están en muy baja concentración. Para la obtención de los resultados se implementó una hoja de cálculo en Microsoft Excel (Microsoft, 2016).

2.9 Manejo de las unidades experimentales.

Se realizó el registro sistemático del comportamiento cualitativo del manejo de las unidades experimentales (tratamientos), a partir del juicio y la experticia del equipo de investigadores.

Se tuvieron en cuenta diversos factores, tales como: manipulación, formación de grumos, degradación del texturizante, retención de humedad y generación de lixiviados (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017).

2.10 Selección de los valores de las variables de operación a utilizar en el escalado de la ecotecnología de biopila.

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación de la degradación de HTP, la evaluación ecotoxicológica y del comportamiento del manejo de las unidades experimentales, se seleccionaron los valores de las variables de operación investigadas a utilizar en el escalado de la ecotecnología de biopila; que aseguren tanto la eficacia de la biorremediación como un manejo adecuado de la biopila.

Se tuvieron en cuenta criterios ingenieriles de la tecnología (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017); así como el juicio y la experticia del equipo de investigadores.

Posteriormente, mediante el modelo obtenido por el diseño de experimento que describió el comportamiento de la concentración de HTP final en función de los factores estudiados, se verificó si para los valores seleccionados de las variables de operación se obtuvo una concentración de HTP final que cumpliera con la norma de disposición final (ONN, 2017), teniendo en cuenta intervalos de incertidumbre del método de ensayo y la propia del modelo ajustado.

Los cálculos anteriores fueron realizados en una hoja de cálculo en Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

2.11 Conclusiones parciales.

1. El procedimiento metodológico elaborado para la evaluación de la influencia de las variables de operación seleccionadas de la ecotecnología de biopilas sobre la

biorremediación de residuos petrolizados, a escala de banco, permitió ordenar secuencialmente los protocolos de la investigación y dar respuesta a los fines de la investigación.

2. Se integraron métodos, técnicas y herramientas de la investigación científica bajo el principio de la convergencia metodológica; destacándose el empleo del diseño de experimentos, balance de masa, diseño ingeniero y el análisis estadístico soportados con el uso de software profesionales y el desarrollo de libros de cálculos Excel.

Capítulo 3

Capítulo 3: Análisis y discusión de los resultados.

En este capítulo se desarrolló el tercer objetivo específico de la investigación. A partir del procedimiento metodológico diseñado e implementado en el capítulo anterior, se obtuvieron resultados los cuales se someten a discusión para la evaluación de la biorremediación de residuos petrolizados mediante la ecotecnología de biopilas a escala de banco, en función de las variables de operación estudiadas. Además, se abordó la selección de las variables de operación a ser utilizadas en el escalado de la ecotecnología de biopilas.

3.1 Caracterización de los materiales (suelo, residuo petrolizado y texturizante).

3.1.1 Elección, acopio y caracterización del suelo.

Se utilizó un suelo pardo grisáceo, característico de la región central de Cuba, de bajo potencial agrícola. La caracterización geotécnica del suelo es la siguiente (ENIA, 2018):

1. De acuerdo a la norma ONN (2000b) Clasificación geotécnica de los suelos (SUCS), el mismo se clasificó como SC -SM Arena arcillo limosa, de baja plasticidad.
2. También, según la valoración de la permeabilidad de acuerdo con el método de Terzaghi y Peck y de acuerdo con la composición granulométrica de este suelo se estima que el mismo se encuentra entre moderadamente permeable y poco permeable con valores estimados de K_f entre 1×10^{-1} y 1×10^{-5} cm/s.

La densidad aparente del suelo utilizado fue de $1\,058,00 \text{ kg/m}^3$. En el anexo 25 se muestran las propiedades físicas del suelo utilizado.

En la tabla 3 se muestra la composición de nitrógeno (N), fósforo (P) y pH del suelo empleado.

Tabla 3: Composición de nitrógeno (N), fósforo (P) y pH del suelo utilizado. Fuente: (UCTB, 2017b).

	N (mg/g)	P (mg/g)	pH
Suelo	1,98	1,24	5,72

La composición elemental del suelo, incluido el pH es característico del tipo de suelo pardo grisáceo. El contenido de nitrógeno y fósforo del suelo fue insuficiente para que la población microbiana pueda asimilar y degradar los componentes del petróleo; lo que justifica la necesidad de adición de texturizantes y enmiendas (EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003).

El pH de suelo está por debajo del rango óptimo (6 -8 unidades) para la actividad microbiana y que deberá ser corregido una vez conformadas las biopilas a partir de la adicción de las enmiendas (EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003).

El contenido de metales pesados en el suelo se observa en la tabla 4.

Tabla 4: Contenido de metales pesados en el suelo. Fuente: (LEA, 2017).

Metales	Unidad de medida	Resultado
Cadmio (Cd)	mg/kg	<L.C*
Plomo (Pb)	mg/kg	<L.C*
Cobre (Cu)	mg/kg	10,30
Hierro (Fe)	%	5,43
Manganeso (Mn)	mg/kg	922,00
Zinc (Zn)	mg/kg	66,00
Níquel (Ni)	mg/kg	6,00
Cromo (Cr)	mg/kg	18,70
Bario (Ba)	mg/kg	902,00
Cobalto (Co)	mg/kg	19,60
Aluminio (Al)	%	2,76

* L.C el Límite de cuantificación.

La concentración total de metales pesados es inferior al límite máximo establecido (BATTELLE & NFESC, 1996; EPA, 2017; Velasco & Volke, 2003), para el correcto funcionamiento del proceso de compostaje mediante biopilas.

3.1.2 Elección, acopio y caracterización del residuo petrolizado.

Como se apuntó en el epígrafe 2.1.2 este residuo procedente un equipo tecnológico de la planta de tratamiento de residuales de la Refinería de Petróleo de Cienfuegos está constituido por sedimentos que se van acumulando con el tiempo en el fondo del equipo, y que es necesario extraerlos antes de comenzar una actividad de mantenimiento y reparación del mismo. Este residuo puede ser clasificado según el Anexo 1 de la Resolución No. 136/2009 como un desecho peligroso, categoría Y11 según la ONN (2017).

La densidad aparente del residuo fue 823 kg/m^3 . La composición química del residual petrolizado se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Composición química del residual petrolizado. Fuente: Fuente: (LEA, 2018).

	Grasas y Aceites (mg/kg)	HTP (mg/kg)
Residual	141 575	123 725

Grasas y Aceites: el contenido de Grasas y Aceites representan un 14,16 % en masa del residual analizado. Se corresponden en su mayoría con derivados de alto peso molecular obtenidos durante el proceso de sedimentación. De acuerdo a estos niveles, se recomienda emplear tecnologías de biorremediación para su manejo y posterior disposición (ONN, 2017).

Hidrocarburos Totales del Petróleo: el contenido de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) representa un 12,37 % en masa del residual, así como un 87,39 % del total de maltenos. El manejo de este tipo de residuo tiene como objetivo principal su almacenamiento temporal, transporte, tratamiento, disposición final y/o eliminación, en condiciones que no generen peligro a la salud o al ambiente. Se establece como criterio de disposición final un contenido de hidrocarburo de hasta un 1 % (10 000 mg/kg) (ONN, 2017).

3.1.3 Elección, acopio y caracterización de los materiales texturizantes.

Se utilizó un texturizante combinado con un 75 % de estiércol vacuno y un 25 % para el bagazo de caña integral. La caracterización físico – química de los texturizantes se muestra en la tabla 6.

Tabla 6: Caracterización químico-física de los materiales texturizantes. Fuente: (UCTB, 2017a).

Texturizantes	N (%)	P (%)	C/N	pH	Densidad aparente (kg/m³)
Estiércol Vacuno	1,91	1,18	12,58	7,48	278
Bagazo de caña integral	0,18	0,03	326,50	5,16	73

Como ya se explicó anteriormente el contenido de nitrógeno y fósforo disponible favorece los procesos microbianos por lo que texturizantes o agentes de volumen con niveles superiores a 1 %, pueden ser considerados como proveedores adecuados de nutrientes. Pudiéndose observar como el estiércol presenta niveles por encima del 1 %, lo cual hace significativo los aportes de este nutriente por cada uno de ellos. En el caso del fósforo, el

estiércol vacuno, también presenta los mayores niveles por encima del 1 %, convirtiéndolo en el texturizante con mayores aportes de este nutriente a los tratamientos (biopilas). Se evidencia además el análisis de la relación C/N, donde también el estiércol presenta menores valores. Por lo que, de los dos agentes de volumen bajo estudio, destaca el estiércol vacuno como el de mayor cantidad de nutrientes biodisponibles para el proceso de compostaje.

Con relación a l pH de los texturizantes se apreció que el pH del estiércol vacuno está en el rango recomendado, mientras que el pH del bagazo de caña integral está por debajo del mismo y es característico de este material. González (2019) demostró que una vez añadidas las enmiendas ocurre un incremento de pH por lo que a pesar de lo anterior se alcanzó el rango óptimo de pH establecido (6-8).

3.2 Diseño de experimentos.

El diseño de experimento se ejecutó tal como fue descrito en el epígrafe 2.2. La tabla 7 muestra el nivel asignado a cada factor estudiado en las 15 corridas experimentales.

Tabla 7: Nivel asignado a cada factor estudiado en las 15 corridas experimentales.

Fuente: Elaboración propia.

Factores Tratamiento	X1 HTP (mg/kg)	X2 Texturizante (%)	X3 Humedad (%)
T1	39 000 (+1)	8 (0)	20 (-1)
T2	30 500 (0)	8 (0)	25 (0)
T3	30 500 (0)	12 (+1)	30 (+1)
T4	30 500 (0)	8 (0)	25 (0)
T5	22 000 (-1)	8 (0)	20 (-1)
T6	30 500 (0)	4 (-1)	20 (-1)
T7	39 000 (+1)	12 (+1)	25 (0)
T8	30 500 (0)	12 (+1)	20 (-1)
T9	22 000 (-1)	8 (0)	30 (+1)
T10	39 000 (+1)	4 (-1)	25 (0)
T11	30 500 (0)	4 (-1)	30 (+1)
T12	22 000 (-1)	12 (+1)	25 (0)
T13	30 500 (0)	8 (0)	25 (0)
T14	22 000 (-1)	4 (-1)	25 (0)
T15	39 000 (+1)	8 (0)	30 (+1)

Los atributos del arreglo experimental utilizado fueron:

1. Clase de diseño: Superficie de Respuesta.

2. Nombre del diseño: diseño de Box -Behnken.
3. Número de factores experimentales: 3 .
4. Número de bloques: 1.
5. Número de corridas: 15, incluyendo 3 puntos centrales por bloque.
6. Grados de libertad para el error: 5.
7. Aleatorizado.

3.3 Diseño ingeniero de las unidades experimentales.

Los resultados del diseño ingeniero de las unidades experimentales, obtenidos a partir del balance de masa a nivel de cada unidad experimental, se muestran en la tabla 8, junto a las dimensiones de las mismas para cada tratamiento. Estas se determinaron haciendo uso de una hoja de cálculo implementada en Microsoft Excel como se muestra en el Anexo 26.

Tabla 8: Resultados del balance de masa y dimensiones de las unidades experimentales.
Fuente: Elaboración propia.

Tratamiento	Masa de suelo (kg)	Masa de residuo petrolizado (kg)	Masa de estiércol vacuno (kg)	Masa de Bagazo (kg)	Longitud de la base (cm)	Ancho de la base (cm)
T1	25,30	13,35	2,52	0,84	88,00	59,00
T2	28,26	10,38	2,52	0,84	87,00	58,00
T3	26,58	10,38	3,78	1,26	92,00	61,00
T4	28,26	10,38	2,52	0,84	87,00	58,00
T5	31,22	7,42	2,52	0,84	87,00	58,00
T6	29,94	10,38	1,26	0,42	83,00	55,00
T7	23,61	13,35	3,78	1,26	92,00	61,00
T8	26,58	10,38	3,78	1,26	92,00	61,00
T9	31,22	7,42	2,52	0,84	87,00	58,00
T10	26,97	13,35	1,26	0,42	83,00	55,00
T11	29,94	10,38	1,26	0,42	83,00	55,00
T12	29,54	7,42	3,78	1,26	92,00	61,00
T13	28,26	10,38	2,52	0,84	87,00	58,00
T14	32,90	7,42	1,26	0,42	82,00	55,00
T15	25,29	13,35	2,52	0,84	88,00	59,00

En la figura 6 se muestra la distribución en planta aleatorizada de las unidades experimentales, según los resultados de los diseños experimental e ingeniero.

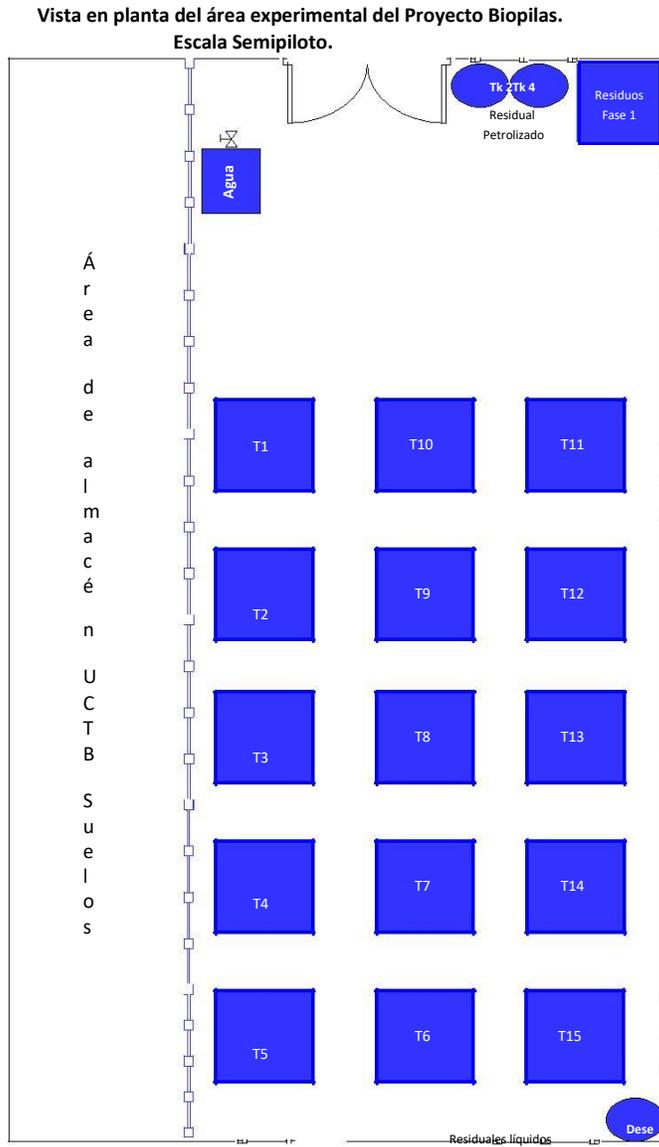


Figura 6: Vista en planta de las unidades en el polígono experimental. Fuente: Elaboración propia.

3.4 Montaje de las unidades experimentales.

En la figura 7 se muestran imágenes del proceso de montaje de las unidades experimentales: homogenización del residual petrolizado (a), mezcla (b), estabilización (c), conformado (d), estandarización (e) y distribución en planta (f).

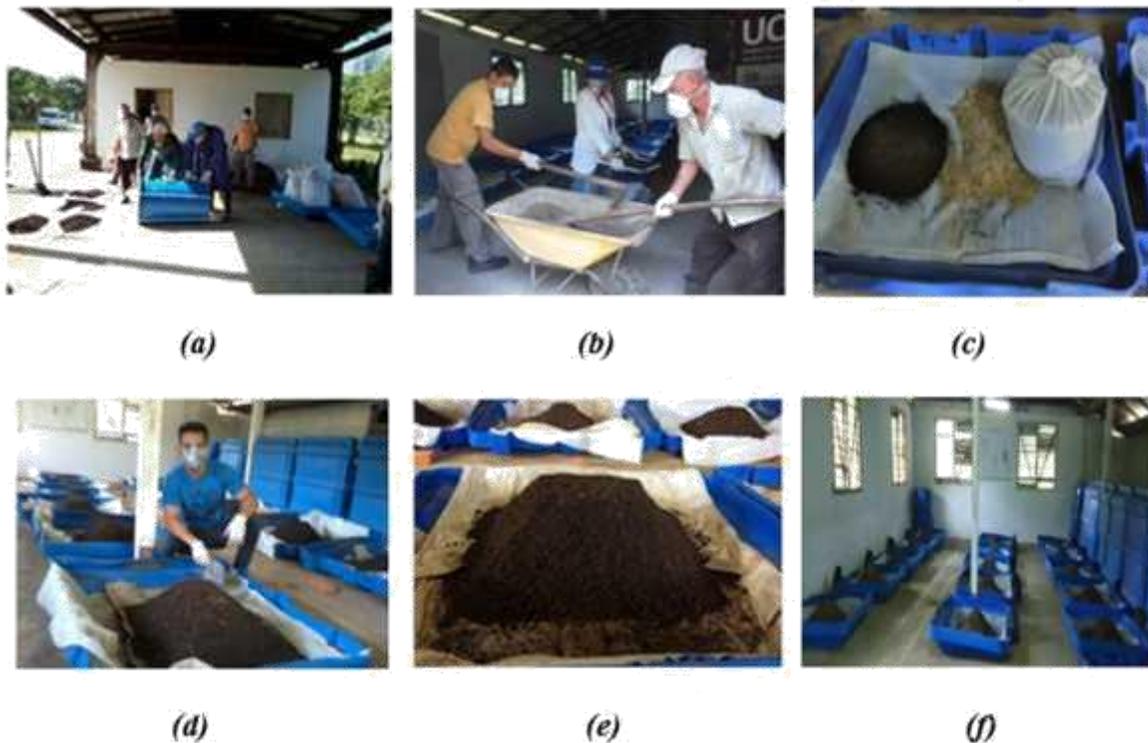


Figura 7: Imágenes proceso de montaje de las unidades experimentales. Fuente: Elaboración propia.

Al ser añadidas las enmiendas necesarias cada unidad experimental alcanzó la relación C:N:P:K dentro del rango establecido en la literatura científica, esta relación se ilustra en la tabla 8.

Tabla 8: Resultados de la masa de enmiendas adicionadas a cada unidad experimental. Fuente: Elaboración propia.

Tratamientos	C	C:N	C:P	C:K
T1	100	10	1,1	0,1
T2	100	10	1,3	0,1
T3	100	10	1,6	0,1
T4	100	10	1,3	0,1
T5	100	10	1,5	0,1
T6	100	10	1,0	0,1
T7	100	10	1,4	0,1
T8	100	10	1,6	0,1
T9	100	10	1,5	0,1
T10	100	10	1,0	0,1
T11	100	10	1,0	0,1
T12	100	10	1,8	0,1

T13	100	10	1,3	0,1
T14	100	10	1,1	0,1
T15	100	10	1,1	0,1

Se corroboró el aporte de nutrientes del texturizante, destacándose el aporte de N y P del estiércol. Por esta razón en varias de las unidades experimentales donde el % de texturizante fue de 8 o 12 % no fue necesario añadir enmienda que aportara fósforo. El aporte de P del texturizante fue mayor que el necesario por lo que aumento su relación C:P en los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13 y 15. El tratamiento 14 con el nivel bajo de texturizante (4 %) tampoco se le añadió fósforo, ya que su contenido de C fue bajo debido al nivel de concentración de HTP.

En los tratamientos 6, 10 y 11 fue necesario añadir P ya que el nivel de texturizante fue bajo y la concentración de HTP se trabajó en el nivel medio o alto.

En el anexo 27 se muestra la hoja de cálculo de Microsoft Excel con el balance de masa para la adicción de enmienda. En el anexo 28 se muestran los resultados de las masa de enmienda adicionada para garantizar la relación C:N:P:K deseada en cada una de las unidades experimentales.

El conformado de las unidades experimentales corroboró la validez del diseño ingeniero. Se estandarizaron las dimensiones de la base, altura y ángulo de reposo para cada tratamiento.

3.5 Monitoreo de las unidades experimentales.

Las unidades experimentales fueron monitoreadas en el transcurso del experimento tal como fue descrito en el epígrafe 2.5.

En el anexo 29 se muestran los datos del monitoreo semanal de temperatura y humedad de las unidades experimentales. En particular se logró mantener la humedad de las unidades experimentales en el valor deseado ± 2 unidades.

En el anexo 30 se muestran los datos del monitoreo físico-químico obtenidos por CEAC y CEIPET a los 0 y 240 días.

En el anexo 31 se muestran los datos de las variables climáticas (INSMET, 2020).

Los datos ecotoxicológicos se muestran en el epígrafe 3.8.

3.6 Análisis estadístico de los datos temperatura y humedad de las unidades experimentales.

El análisis estadístico de los datos del monitoreo semanal de la temperatura y humedad de las unidades experimentales arrojó los siguientes resultados:

Temperatura:

Se comprobaron la normalidad, varianza constante e independencia de los datos de temperatura de las unidades experimentales. Así como el supuesto de que los datos de las variables climáticas temperatura ambiente y humedad media relativa provienen de una distribución normal como se muestra en el anexo 32.

Se corroboró que no existieron diferencias significativas entre las medias de la temperatura de los 15 tratamientos. En la tabla 9 se muestra el ANOVA.

Tabla 9: Análisis de Varianza para Temperatura. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	14,0043	15	0,93362	0,45	0,9640
Intra grupos	1000,9	480	2,08521		
Total (Corr.)	1014,91	495			

La razón F es el cociente entre el estimado del cuadrado medio entre grupos y el estimado de dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la razón -F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las temperaturas de los 15 tratamientos con un nivel del 95,0 % de confianza.

Estos resultados se corresponden con el comportamiento de la temperatura en las unidades experimentales en la fase precedente de la investigación (Casals et al., 2020; González, 2019). Lo anterior puede ser explicado a partir de los criterios expuestos por Behrentz y Giraldo (1999) que refieren que en biopilas a pequeñas escalas existe un valor grande para la razón existente entre el área superficial de las biopilas y el volumen reaccionante, que impide que no se acumule el calor de reacción y por lo tanto no se logran las temperaturas que caracterizan este tipo de sistemas en condiciones reales de operación.

Considerando que no existen diferencias significativas de medias entre las temperaturas de cada tratamiento y que todos poseen la misma cantidad de observaciones, se promediaron dichos valores para obtener una temperatura de tratamientos promedio (intratratamientos).

En la tabla 10 se muestra la media de las temperaturas de los 15 tratamientos y la temperatura intratratamientos; el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo, este error es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y se pueden observar gráficamente en el anexo 33 mediante la gráfica de medias. Además, se observan los grupos homogéneos formados.

Tabla 10: Medias con intervalos de confianza del 95.0 % y grupos homogéneos (porcentaje LSD). Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Tratamientos	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior	Grupos Homogéneos
Tratamiento 11 T	31	24,258	0,259355	23,8977	24,6184	X
Tratamiento 15 T	31	24,274	0,259355	23,9138	24,6345	X
Tratamiento 7 T	31	24,407	0,259355	24,0461	24,7668	XX
Tratamiento 5 T	31	24,413	0,259355	24,0526	24,7733	XX
Tratamiento 6 T	31	24,465	0,259355	24,1042	24,8249	XX
Tratamiento 10 T	31	24,468	0,259355	24,1074	24,8281	XX
Tratamiento 14 T	31	24,5	0,259355	24,1397	24,8603	XX
Tratamiento 13 T	31	24,532	0,259355	24,1719	24,8926	XX
Temperatura intratratamientos	31	24,534	0,259355	24,1738	24,8945	XX
Tratamiento 12 T	31	24,565	0,259355	24,2042	24,9249	XX
Tratamiento 8 T	31	24,587	0,259355	24,2267	24,9474	XX
Tratamiento 4 T	31	24,597	0,259355	24,2364	24,9571	XX
Tratamiento 3 T	31	24,629	0,259355	24,2687	24,9894	XX
Tratamiento 9 T	31	24,645	0,259355	24,2848	25,0055	XX
Tratamiento 2 T	31	24,677	0,259355	24,6397	25,3603	XX
Tratamiento 1 T	31	25,0	0,259355	24,6397	25,3603	X

Como se puede observar se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. Por lo anterior se infiere que solo existe una diferencia estadísticamente significativa entre las temperaturas del tratamiento 1 y 11 y las temperaturas del tratamiento 1 y 15.

El resto no presentan diferencia estadísticamente significativa.

Asimismo, la temperatura intratratamientos no presenta diferencias estadísticamente significativas con ningún tratamiento para un 95 % de confianza. Ello se puede corroborar gráficamente según la figura 8 que muestra los diagramas de cajas y bigotes de las temperaturas de los 15 tratamientos y las temperaturas intratratamientos

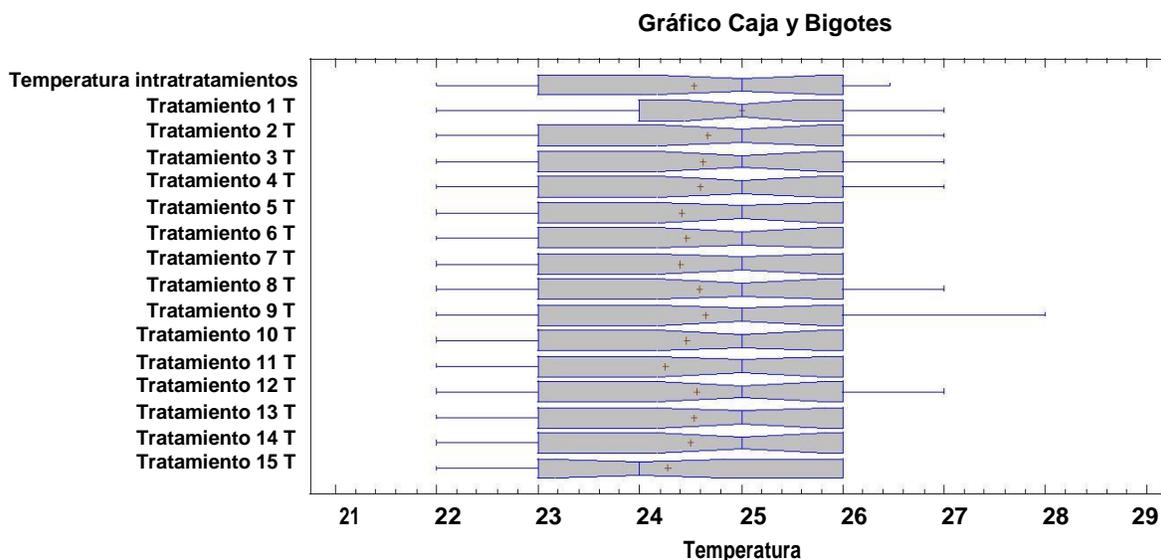


Figura 8: Gráfico de cajas y bigotes para comparar la Humedad entre Tratamientos.

Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

En este caso se observa que la mayoría de los valores de temperatura de todos los tratamientos oscilan entre 23 °C y 26 °C excepto el del tratamiento 1 que la mayoría de sus valores están entre 24 °C y 26 °C. La línea azul y la cruz indican la mediana y la media de los tratamientos respectivamente, por lo que podemos concluir que todos los tratamientos poseen la misma mediana exceptuando al tratamiento 15 cuyo valor se queda una unidad por debajo del resto.

Las medias de las 16 variables analizadas oscilan entre 24 °C y 25 °C, estando en el extremo inferior del intervalo las medias de los tratamientos 11 y 15, y la media del tratamiento 1 en el extremo superior del mismo. Se reafirmó que solo existe una diferencia estadísticamente significativa entre las temperaturas del tratamiento 1 y 11, y las temperaturas del tratamiento 1 y 15.

Se graficaron las temperaturas de los 15 tratamientos para cada semana del estudio y se

incluyeron los valores de la temperatura ambiente promedio en las mismas frecuencias como lo muestra la gráfica del anexo 34, mostrando un comportamiento similar.

Se realizó un análisis multivariado para analizar las correlaciones que existen entre la temperatura de cada tratamiento y las variables ambientales: temperatura ambiente media, humedad relativa media, precipitaciones acumuladas y vientos medios. En el anexo 35 se muestra la matriz de correlación que arrojó dicho análisis.

Según los coeficientes de Pearson se aprecia que existe una correlación fuerte y directa entre las temperaturas de los 15 tratamientos y la temperatura intratratamientos.

Del mismo modo se observó una correlación significativa, moderada y directa entre las temperaturas intratratamientos y las temperaturas de los 15 tratamientos con respecto a las variables ambientales: humedad relativa media y temperatura ambiental media. Estos resultados también se corresponden con la investigación precedente (Casals et al., 2020; González, 2019) y se explican de por sí solo por el efecto de las variables climáticas sobre el comportamiento termodinámico de las unidades experimentales.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó una regresión lineal múltiple entre los valores de temperatura intratratamientos y los valores de temperatura media y humedad relativa del ambiente. En la ecuación 11 se muestra el modelo de regresión lineal múltiple obtenido, que muestra una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0 %. En el anexo 36 se muestran los resultados estadísticos.

Ecuación 11: Modelo que describe el comportamiento de la temperatura intratratamientos con respecto a la temperatura ambiente y humedad media relativa. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Donde:

TI: Temperatura intratratamientos ($^{\circ}\text{C}$).

X₁: Temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$).

X₂: Humedad media relativa (%).

Humedad:

Se comprobaron la normalidad, varianza constante e independencia de los datos de humedad de las unidades experimentales como se muestra en el anexo 37.

Se corroboró que existieron diferencias significativas entre las medias de las humedades de los 15 tratamientos. En la tabla 11 se muestra el ANOVA.

Tabla 11: Análisis de Varianza para Humedad. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4949,67	14	353,548	516,27	0,0000
Intra grupos	275,977	403	0,684808		
Total (Corr.)	5225,64	417			

La razón F es el cociente entre el estimado del cuadrado medio entre grupos y el estimado de dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la razón -F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las temperaturas de los 15 tratamientos con un nivel del 95,0 % de confianza.

En la gráfica de caja y bigotes que se muestra en la figura 9 se observó la existencia de puntos alejados en todos los tratamientos 1, 3, 7 y 8; indicativos de posibles valores aberrantes.

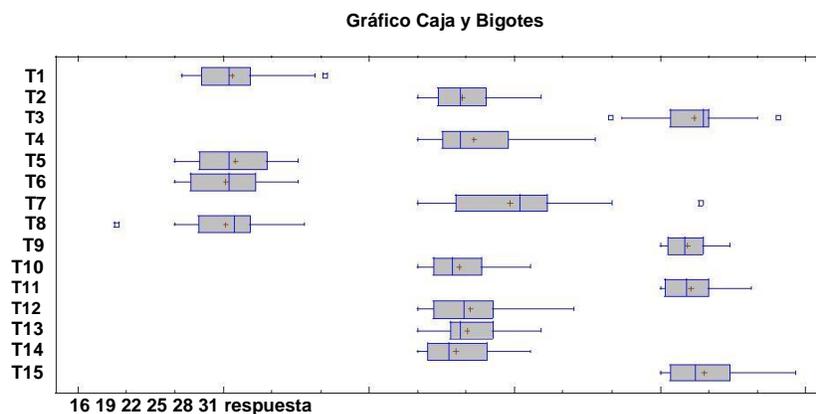


Figura 9: Gráfico de cajas y bigotes para comparar la Humedad entre Tratamientos. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se realizó el análisis de identificación de valores atípicos en los 15 tratamientos. No se detectaron observaciones aberrantes. En los tratamientos 1, 3, 8 y 7 se observan puntos fuera del intervalo, pero al no estar tan alejados una vez realizados el análisis no hubo datos aberrantes en dichos tratamientos. En el anexo 38 se muestra el procedimiento seguido para la identificación de valores atípico en el tratamiento 1. De forma análoga se realizó para los demás tratamientos.

La tabla 12 muestra la media de las humedades de los 15 tratamientos y el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo, este error es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y se pueden observar gráficamente en el anexo 39 mediante la gráfica de medias. Además, se observan los grupos homogéneos formados.

Tabla 12: Medias con intervalos de confianza del 95,0 % y grupos homogéneos (porcentaje LSD). Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T6	27	19,0474	0,159258	18,826	19,2688	X
T8	29	19,0479	0,153669	18,8343	19,2615	X
T1	27	19,1878	0,159258	18,9664	19,4092	X
T5	28	19,2425	0,156389	19,0251	19,4599	X
T14	27	23,7959	0,159258	23,5745	24,0173	X
T10	30	23,8483	0,151086	23,6383	24,0584	X
T2	29	23,9386	0,153669	23,725	24,1522	X
T13	29	24,0162	0,153669	23,8026	24,2298	X
T12	30	24,0973	0,151086	23,8873	24,3074	X
T4	29	24,169	0,153669	23,9554	24,3826	X
T7	29	24,8941	0,153669	24,6805	25,1077	X
T9	28	28,5525	0,156389	28,3351	28,7699	X
T11	25	28,6412	0,165506	28,4111	28,8713	X
T3	27	28,6922	0,159258	28,4708	28,9136	X
T15	24	28,9154	0,168919	28,6806	29,1502	X

Se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. Por lo anterior se puede decir que no existe diferencia estadísticamente

significativa entre: los tratamientos 6, 8, 1 y 5 cuyas medias de humedad son aproximadamente del 19 %; entre los tratamientos 14, 10, 2, 13, 12, 4 y 7 cuyas medias de humedad son del 24 % aproximadamente y entre los tratamientos 9, 11, 3 y 15 cuyas medias son de aproximadamente del 28,5 %. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

También se realizó un análisis de conglomerados, utilizando el método de Ward, el cual agrupó los 15 tratamientos en 3 conglomerados teniendo en cuenta sus valores de humedad como se muestra en el Dendograma de la figura 10.

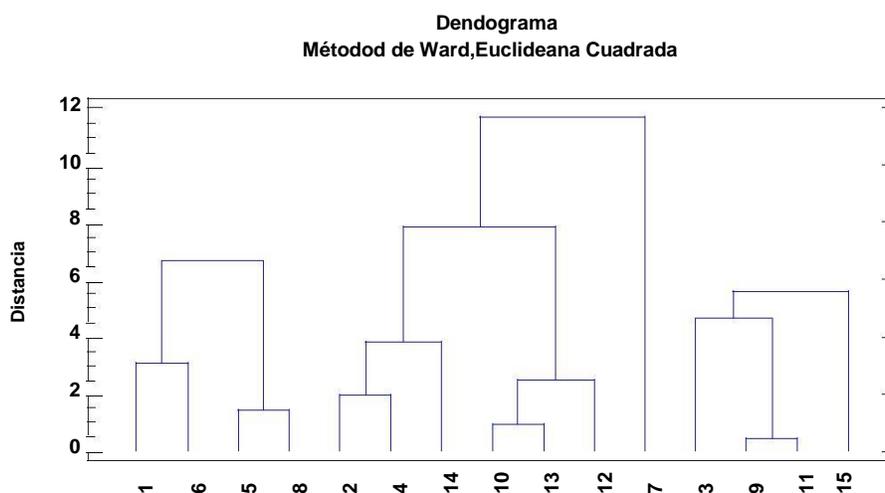


Figura 10: Dendograma. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Los conglomerados son grupos de observaciones con características similares. Para formar los conglomerados, el procedimiento comienza con cada observación en grupos separados. Después, combina las dos observaciones que fueron los más cercanos para formar un nuevo grupo. Después de recalcular la distancia entre grupos, se combinan los dos grupos ahora más cercanos. Este proceso se repite hasta que quedan solamente 3 grupos de forma tal que los tratamientos en un mismo grupo sean lo más semejante posible en cuanto a humedad se refiere y los tratamientos entre los grupos todo lo contrario, lo más diferente posible en cuanto a humedad se refiere.

En el Dendograma mostrado en la figura 10 se definieron tres conglomerados en correspondencia con los niveles deseados y el intervalo de variación del factor humedad de:

Conglomerado 1: Tratamientos 1, 6, 5 y 8. Estos fueron los tratamientos que corresponden al nivel bajo del factor humedad en el experimento cuyo valor fue de $20 \pm 2 \%$

Conglomerado 2: Tratamientos 2, 4, 14, 10, 13, 12 y 7. Estos fueron los tratamientos que corresponden al nivel medio del factor humedad en el experimento cuyo valor se fijó en el rango de $25 \pm 2 \%$

Conglomerado 3: Tratamientos 3, 9, 11 y 15. Estos fueron los tratamientos que corresponden al nivel alto del factor humedad en el experimento cuyo valor se fijó en el rango de $30 \pm 2 \%$

Los resultados anteriores corroboran que se logró establecer la diferenciación entre los niveles del factor humedad según lo previsto en el diseño experimental. En el anexo 40 se observa el Diagrama de Dispersión de Conglomerados en 3D y la Gráfica de Distancia de Aglomeración.

Se construyó el Gráfico X Individual de Control (Gráfico de Individuos) para cada tratamiento para determinar si los datos provienen de un proceso en control estadístico. La figura 11 muestra el gráfico correspondiente al tratamiento 1.

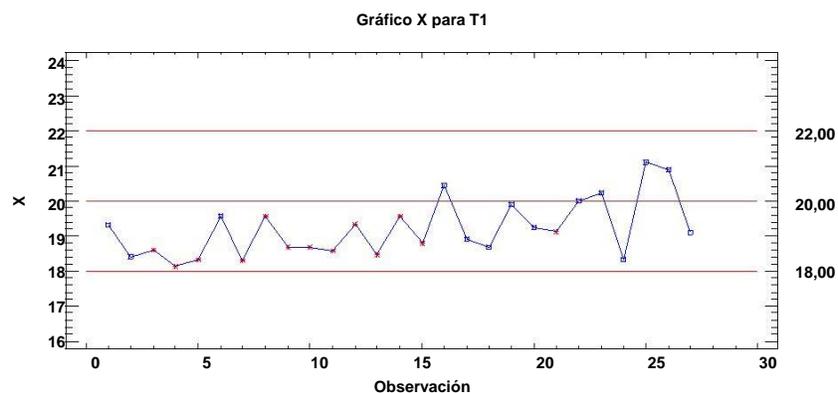


Figura 11: Gráfico X de la humedad del tratamiento 1. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

De las 27 observaciones mostradas en el gráfico, 0 se encuentran fuera de los límites de control establecidos para el factor humedad en el tratamiento 1 ($20 \pm 2 \%$). Puesto que la

probabilidad de que aparezcan 0 o más puntos fuera de límites, sólo por azar, es 1,0, no se puede rechazar la hipótesis de que el proceso se encuentra en estado de control estadístico con un nivel de confianza del 95 %. No obstante, si bien el 50 % del control estadístico son los puntos fuera de los límites de control, el otro 50 % de la estabilidad o control estadísticos se debe a que no haya presencia de patrones especiales y en ese gráfico los puntos 5 y 6 y del 18 al 16 son asteriscos rojos, o lo que es igual puntos especiales que indican patrones de falta de control.

De forma análoga, se construyeron los Gráficos de Individuos del resto de tratamientos, mostrando todos los mismos resultados.

En el anexo 41 se muestra un gráfico resumen del comportamiento de la humedad de los 15 tratamientos, observándose que esta variable se mantuvo dentro de los límites de control establecidos para la variable de operación según el nivel deseado en el diseño experimental.

3.7 Evaluación de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).

3.7.1 Análisis de la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).

En el anexo 42 se muestran los datos primarios de concentración de HTP para el tiempo 0 días, la media de los datos de concentración de HTP entre CEINPET y CEAC para 240 días, y los resultados de los cálculos de porcentaje de remoción (% R) y masa de HTP removida.

En las figuras 12 y 13 se muestran en Gráficos de Barra el comportamiento de la masa de HTP removida y el porcentaje de remoción de HTP en las unidades experimentales respectivamente.

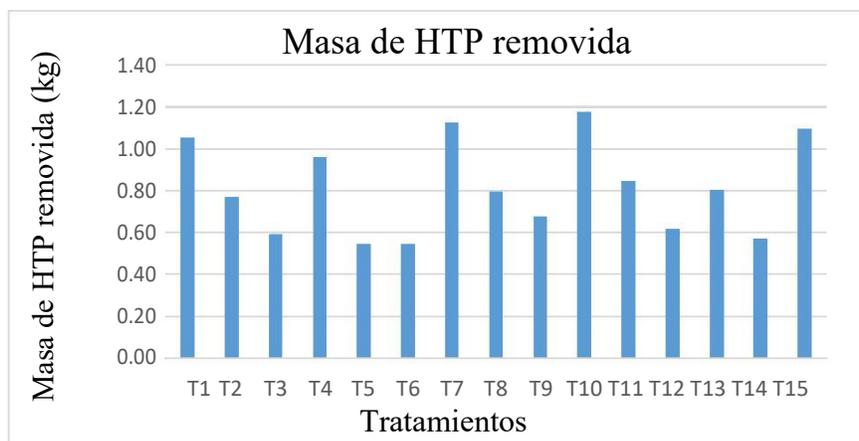


Figura 12: Gráfico de Barras que muestra el total de masa de HTP removida para cada tratamiento. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

En el gráfico de la figura 12 se observó que la masa de HTP se movió entre 0,55 y 1,18 kg. Los tratamientos que lograron remover más de 1 kg de HTP fueron los tratamientos 1, 7, 10 y 15. A estos tratamientos les corresponde el nivel alto del factor concentración inicial de HTP, indicando que dicho factor pudiera tener una mayor incidencia en el comportamiento de esta variable.

Se obtuvo que para un mismo nivel del factor concentración inicial de HTP, la mayor masa de HTP removida fue para las unidades experimentales con el factor humedad en su nivel medio o alto por ejemplo: de los 4 tratamientos antes mencionados el 7 y el 10 a los cuales le corresponden el factor humedad en su nivel medio y el tratamiento 15 cuyo factor de humedad está en el nivel alto presentan mayor masa de HTP removida que el tratamiento 1 cuyo factor de humedad está en el nivel bajo.

Los tratamientos 5, 9, 12 y 14 tuvieron menor masa de HTP removida, y se corresponde con el factor concentración inicial de HTP en su nivel bajo. Para estas condiciones se incrementa la masa de HTP removida se incrementa cuando el factor % de humedad estuvo en su nivel alto y medio.

Analizando el gráfico de la figura 12, el factor que mayor peso tiene en la variable masa de HTP removida es la concentración de HTP seguida del factor humedad. No se apreció en este análisis un patrón definido de la incidencia del factor % de texturizante la variable de respuesta analizada.

En el gráfico de la figura 13 se observó que el porcentaje de remoción de HTP se movió entre 46,93 % y 82,76 %. González (2019) reportó porcentos de remoción utilizando estiércol vacuno y el bagazo de caña integral del orden de 59,12 % y 43,49 % respectivamente.

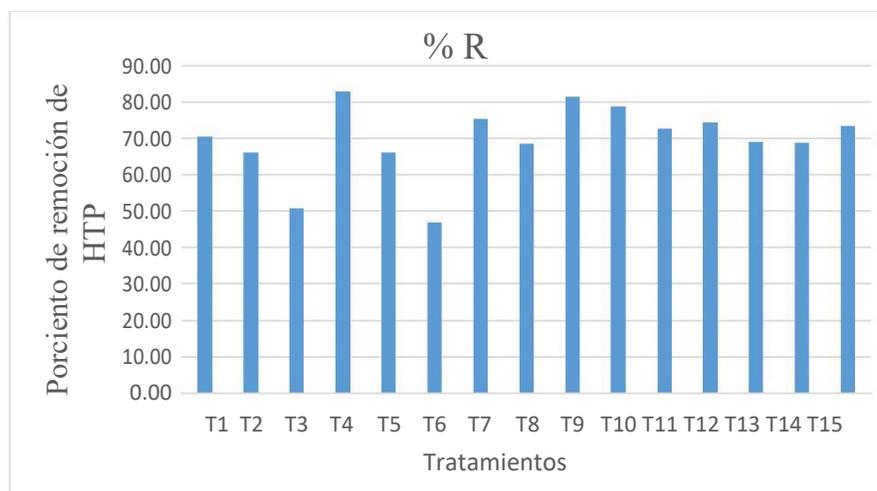


Figura 13: Gráfico de Barras que muestra el porcentaje de remoción de HTP obtenido para cada tratamiento. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

No se apreció en este análisis un patrón definido de la incidencia de los factores estudiados sobre la variable de respuesta % de remoción de HTP, ni una relación marcada con la masa de HTP removida.

3.7.2 Análisis e interpretación de los resultados del diseño o experimental.

Masa de HTP removida:

La tabla 13 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y sus interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo, así como el factor de inflación de varianza (V.I.F) .

Tabla 13: Efectos estimados para Masa de HTP removida (kg). Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	0,843333	0,0419457	
A: Concentración HTP	0,5075	0,0513728	1,00
B: % de texturizante	-0,005	0,0513728	1,00

C: % de humedad	0,0675	0,0513728	1,00
AA	0,176667	0,0756187	1,01
AB	-0,055	0,0726521	1,00
AC	-0,04	0,0726521	1,00
BB	-0,118333	0,0756187	1,01
BC	-0,255	0,0726521	1,00
CC	-0,173333	0,0756187	1,01

Se puede observar en la tabla 13 que el valor del V.I.F más grande, es igual a 1,01 y les corresponde a las interacciones cuadráticas (AA, BB y CC) por lo que estamos en presencia de un diseño perfectamente ortogonal. Factores de 10 o más de los cuales hay 0 normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

En el anexo 43 se muestra la matriz de correlación en la cual se observa el grado de confusión entre los efectos, la misma corrobora que el diseño es perfectamente ortogonal. Un diseño perfectamente ortogonal mostrará una matriz diagonal con 1's en la diagonal y 0's fuera de ella. Cualquier término distinto de cero implica que los estimados de los efectos correspondientes a esa fila y columna estarán correlacionados.

La tabla 14 muestra el ANOVA, que particiona la variabilidad de masa de HTP removida en piezas separadas para cada uno de los efectos, además prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

Tabla 14: Análisis de Varianza para la masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Concentración HTP	0,515113	1	0,515113	97,59	0,0002
B: % de texturizante	0,00005	1	0,00005	0,01	0,9262
C: % de humedad	0,0091125	1	0,0091125	1,73	0,2459
AA	0,0288103	1	0,0288103	5,46	0,0667
AB	0,003025	1	0,003025	0,57	0,4832
AC	0,0016	1	0,0016	0,30	0,6056
BB	0,0129256	1	0,0129256	2,45	0,1784
BC	0,065025	1	0,065025	12,32	0,0171
CC	0,0277333	1	0,0277333	5,25	0,0705
Error total	0,0263917	5	0,00527833		
Total (corr.)	0,694693	14			

En este caso, los efectos concentración de HTP (A) y la interacción % de texturizantes y % de humedad (BC) tienen una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0 %.

En el anexo 44, el Diagrama de Pareto Estandarizado muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. Esto es equivalente a calcular el estadístico - t para cada efecto. La línea vertical puede utilizarse para juzgar cuáles efectos son estadísticamente significativos. De esta forma se corroboró la información de la tabla 14 (ANOVA).

Siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 2.7.1, se comenzaron a depurar los coeficientes que no fueron significativos en el modelo. Las interacciones AC y AB se eliminaron al ser las interacciones que menos influencias tenían sobre la variable de respuesta analizada según su valor -P; además se incrementó el valor del R^2_{aj} y se logró un mayor número de términos (efectos) significativos en el modelo como es el caso de las interacciones cuadráticas AA y CC. De esta forma se obtuvo el ANOVA mejorado que se observa en la tabla 15.

Tabla 15: Análisis de Varianza mejorado para la masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Concentración HTP	0,515113	1	0,515113	116,25	0,0000
B: % de texturizante	0,00005	1	0,00005	0,01	0,9184
C: % de humedad	0,0091125	1	0,0091125	2,06	0,1947
AA	0,0288103	1	0,0288103	6,50	0,0381
BB	0,0129256	1	0,0129256	2,92	0,1314
BC	0,065025	1	0,065025	14,68	0,0065
CC	0,0277333	1	0,0277333	6,26	0,0409
Error total	0,0310167	7	0,00443095		
Total (corr.)	0,694693	14			

Los efectos de primer orden % de texturizante (B) y % de humedad (C) a pesar de no ser significativos se mantuvieron puesto que fue necesario obtener un modelo jerárquico, teniendo en cuenta que en la MSR se prefieren modelos jerárquicos y al ser la interacción BC

significativa para lograr la jerarquía en el modelo se términos mantuvieron ambos de primer orden.

En el caso de la interacción cuadrática BB se mantuvo en el modelo a pesar de no ser significativa porque al depurarla, el R^2_{aj} del modelo disminuía, lo cual es negativo porque el nuevo modelo obtenido explicaba en menor porcentaje los cambios en variable de respuesta.

En la figura 14 se muestra el Diagrama de Pareto Estandarizado construido a partir del ANOVA mejorado, en el cual se representan los efectos divididos entre su error estándar en orden decreciente de importancia.

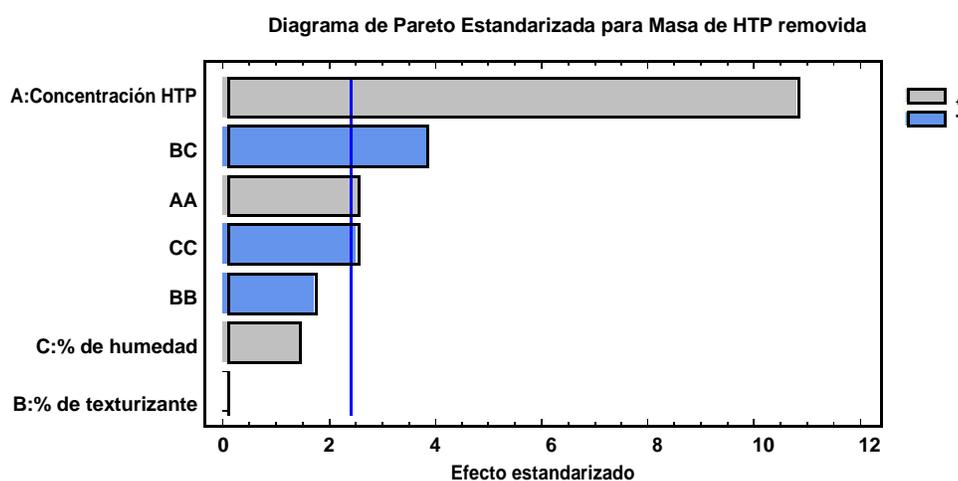


Figura 14: Diagrama de Pareto Estandarizada para la masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se corroboró el resultado del ANOVA mejorado al observar en el Diagrama de Pareto de la figura 14 cuatro efectos significativos: A, BC, AA y CC, y tres efectos no significativos como BB, C y B.

En la figura 15 se observa la Gráfica de Efectos Principales, la cual muestra los estimados de masa de HTP removida como una función de cada factor experimental. En cada gráfica, el factor de interés se varía de su nivel bajo a su nivel alto, mientras que los demás factores se mantienen constantes en sus valores centrales.

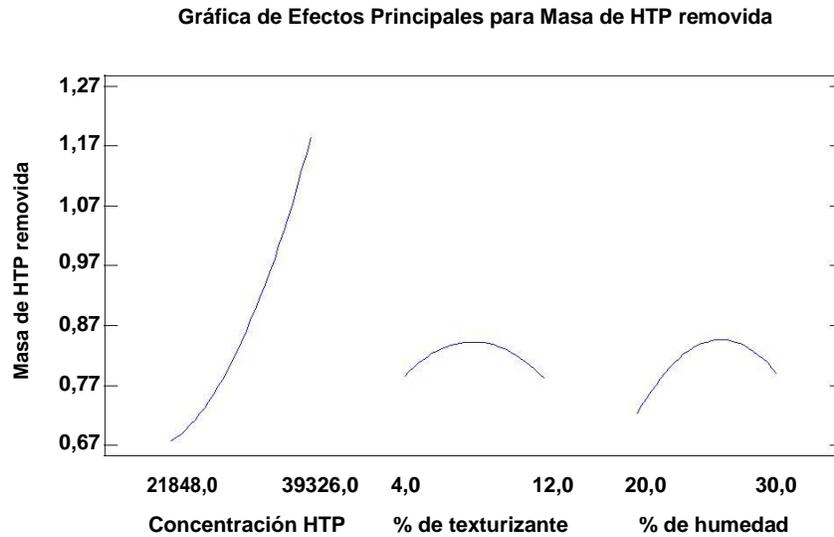


Figura 15: Gráfica de Efectos Principales para masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede observar en la figura 15, el efecto principal del factor A (Concentración de HTP) es mayor que el del factor B (% de texturizante) y C (% de humedad), pues al aumentar el nivel del factor A, aumenta mucho más la variabilidad de la respuesta que al aumentar los niveles de los factores B y C.

En figura 16 se observa la Gráfica de Interacción donde se muestra el estimados de masa de HTP removida en función del par de factores % de texturizante y % de humedad, interacción BC, al ser la interacción entre ambos significativa en el modelo. Se varía el factor B de su nivel bajo a su nivel alto. En una línea, el factor C se mantiene en su nivel bajo, en la otra línea, el factor C se mantiene a su nivel alto. El factor A en este caso se mantuvo constante en su nivel medio.

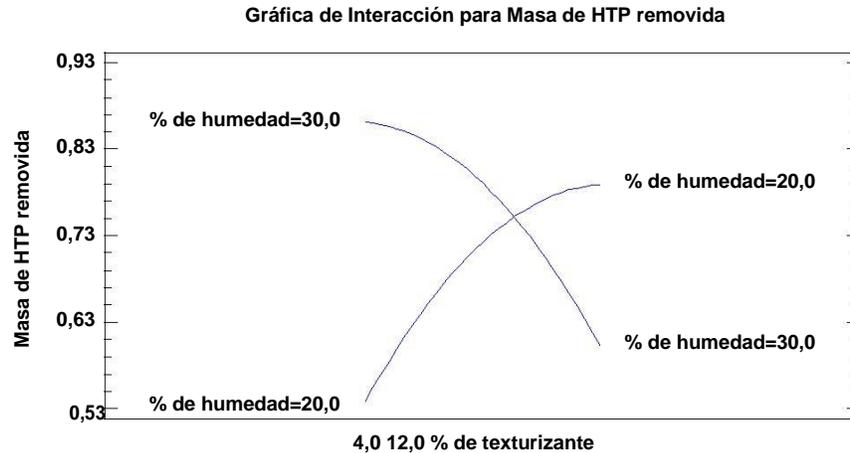


Figura 16: Gráfica de Interacción para masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

En la figura 16, se aprecia que el efecto de la interacción BC, en el cual se observa que para obtener mayor cantidad de masa de HTP removida el efecto de incrementar % de texturizante (B) es positivo siempre y cuando el % de humedad (C) se mantenga en su nivel bajo (20 %) porque si C está en su nivel alto al incrementar B ocurre un efecto negativo (se obtienen una menor masa de HTP removida). Del mismo modo es positivo (aumenta la masa de HTP removida) disminuir el efecto de B manteniendo C en su nivel alto (30 %).

Existe un punto de corte entre los niveles bajo y alto del factor % de humedad (C) al cual le corresponde aproximadamente un 9,06 % del factor % de texturizante (B); interpretándose de esta forma que al mantener el factor concentración inicial de HTP en su nivel medio y B en 9,06 % aproximadamente, la masa de HTP removida será de 0,75 mg/kg independientemente que se utilice el factor C en su nivel bajo o alto

Se buscó el punto (extremo de la curva) más alto con respecto a la escala de la masa de HTP removida y se obtuvo que los mejores niveles para los factores B y C son: B en su nivel bajo (4 %) y C en su nivel alto (30 %).

En la tabla 16 se observan los coeficientes de regresión del modelo ajustado de la ecuación 12, el cual describe el comportamiento de la masa de HTP en función de los efectos del ANOVA mejorado.

Tabla 16: Coeficientes de regresión para Masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Coeficiente	Estimado
constante	-2,80477
A: Concentración HTP	-0,0000417203
B: % de texturizante	0,217917
C: % de humedad	0,231083
AA	1,15665E-9
BB	-0,00369792
BC	-0,006375
CC	-0,00346667

$$MR = -2,80477 - 0,0000417203 \cdot X + 0,217917 \cdot X + 0,231083 \cdot X + 1,15665 \cdot 10 \quad (12)$$

$\cdot X - 0,00369792 \cdot X - 0,006375 \cdot X X - 0,00346667 \cdot X$
Ecuación 12: Modelo matemático ajustado que describe el comportamiento de la variable de respuesta en función de los efectos del ANOVA mejorado. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Donde:

MR: masa de HTP removida (kg).

$X_1 = A$: concentración inicial de HTP (mg/kg).

$X_2 = B$: % de texturizante.

$X_3 = C$: % de humedad.

Estadísticos del modelo:

$$R^2 = 95,54 \%$$

$$R^2_{aj} = 91,07 \%$$

Error estándar del est. = 0,0665654

Error absoluto medio = 0,0332222

Estadístico Durbin-Watson = 2,01602 (P=0,4163)

El coeficiente de determinación (R^2) indica que el modelo, así ajustado, explica el 95,54 % de la variabilidad en masa de HTP removida. El coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 91,07 % mayor que el 70 % requerido. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,0665654. El error medio absoluto (MAE) de 0,0332222 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 95,0 %.

La tabla 17 contiene información acerca de los valores de masa de HTP removida generados usando el modelo ajustado. La tabla incluye:

- (1) los valores observados de masa de HTP removida.
- (2) el valor predicho de masa de HTP removida usando el modelo ajustado.
- (3) el residuo (valor observado – valor predicho).
- (4) intervalos de confianza del 95,0 % para la respuesta media.

Tabla 17: Resultados Estimados para masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

	<i>Observados</i>	<i>Ajustados</i>		<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
<i>Fila</i>	<i>Valores</i>	<i>Valores</i>	<i>Residuo</i>	<i>para Media</i>	<i>para Media</i>
1	1,1	1,1325	-0,0325	1,0212	1,2438
2	1,05	1,065	-0,015	0,9537	1,1763
3	0,55	0,53875	0,01125	0,402435	0,675065
4	0,77	0,843333	-0,0733333	0,752457	0,93421
5	0,8	0,78875	0,01125	0,652435	0,925065
6	0,96	0,843333	0,116667	0,752457	0,93421
7	0,55	0,5575	-0,0075	0,4462	0,6688
8	0,85	0,86125	-0,01125	0,724935	0,997565
9	1,18	1,12875	0,05125	1,01745	1,24005
10	0,59	0,60125	-0,01125	0,464935	0,737565
11	1,12	1,12375	-0,00375	1,01245	1,23505
12	0,62	0,61625	0,00375	0,50495	0,72755
13	0,57	0,62125	-0,05125	0,50995	0,73255

14	0,8	0,843333	-0,0433333	0,752457	0,93421
15	0,68	0,625	0,055	0,5137	0,7363

En la figura 17 se muestra el grafico de cubo, en el cual se observan los valores de la respuesta predicha, cuando los factores toman niveles extremos (bajo o alto).

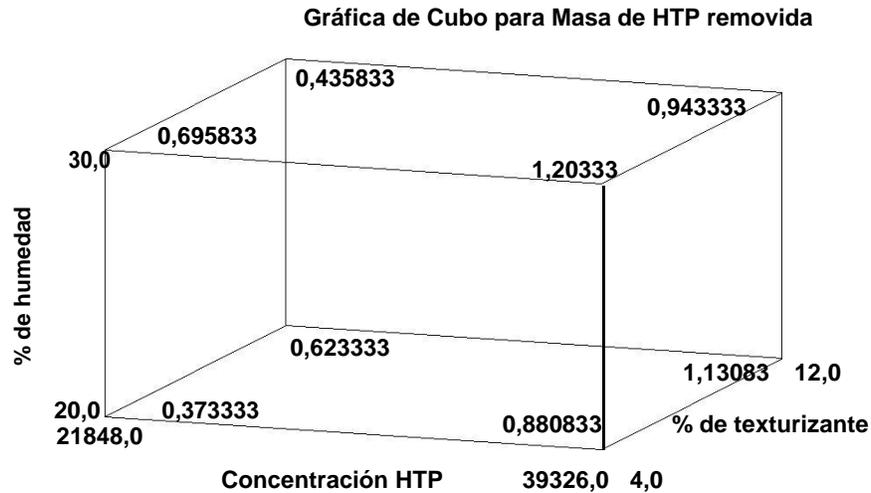


Figura 17: Gráfica de Cubo para masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Las mayores masas de HTP removidas se hallan a la derecha del cubo corroborado que el factor concentración inicial de HTP es el que más influye en la variabilidad de la respuesta entre los tres factores estudiados. También se observa que al aumentar el factor % de texturizante, manteniendo humedad baja y al disminuir el % de texturizante manteniendo la humedad alta, la masa de HTP removida aumenta en ambos casos sin tener en cuenta el nivel en que se encuentre la concentración inicial de HTP. Asimismo, se obtiene la mayor masa de HTP removida con una concentración inicial de HTP en su nivel alto (39 326 mg/kg), un % de texturizante en su nivel bajo (4 %) y un % de humedad en su nivel alto (30 %).

En el anexo 45 se observan las gráficas de cuadrado para concentración inicial de HTP vs % de humedad, manteniendo el % de texturizante en su nivel medio, y concentración inicial de HTP vs % de texturizante, manteniendo % de humedad en su nivel medio.

En la figura 18 se observa el gráfico de mallas que representa el gráfico de superficie de respuesta, estimada del modelo, en 3D obtenido.

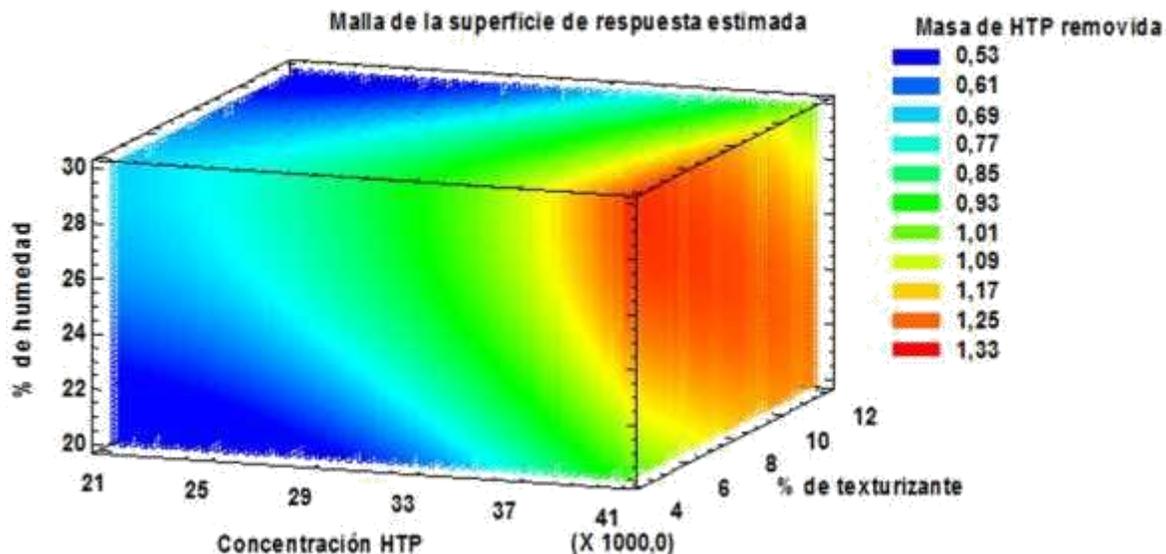


Figura 18: Malla de superficie de respuesta estimada. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

En el gráfico de malla de superficie de respuesta de la figura 18, se observa como el color rojo-naranja, representa la mayor masa de HTP removida (entre 1,17 y 1,33 kg), la cual se encuentra en la región comprendida por los niveles del bajo al alto de los factores % de humedad y % de texturizante y por el nivel alto del factor concentración de HTP inicial.

Se aprecia una coloración rojo -naranja más intensa alrededor del vértice que le corresponden los factores % de humedad y concentración inicial de HTP en su nivel alto y el % de texturizante en su nivel bajo. También se logran obtener valores elevados de masa de HTP removida en niveles bajos de % de humedad y alto de % de texturizante, pero manteniendo concentración inicial de HTP siempre en su nivel alto.

Supuestos del diseño:

Normalidad:

La gráfica de Probabilidad Normal (a) y el Histograma (b) para los residuos de la figura 19 ayudaron a determinar si los residuos siguen la distribución normal supuesta, o no. Se ha escalado de tal modo que, si los residuos siguen una distribución normal, los puntos caerán

aproximadamente a lo largo de una línea recta. Cualquier desviación consistente de la línea recta sería un signo de comportamiento no normal, el cual a menudo puede corregirse transformando los valores de masa de HTP removida.

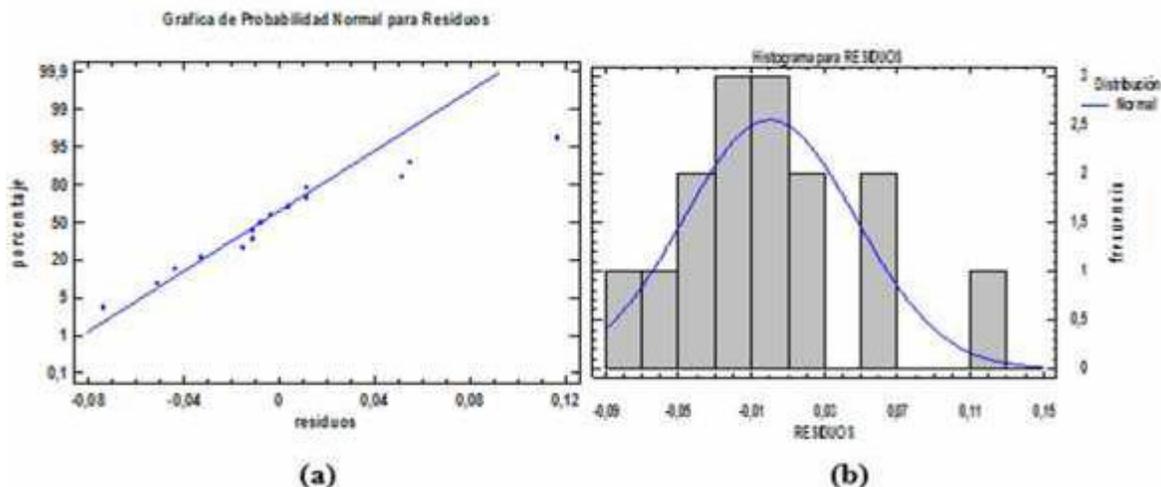


Figura 19: (a) Gráfica de Probabilidad Normal para los residuos de la masa de HTP removida y (b) Histograma de residuos para la masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se observaron los residuos del modelo bastante ajustado a la línea recta. En Histograma de Residuos se encuentra ajustado a la línea de Distribución Normal (campana de Gauss).

Además, se corroboró la distribución de normalidad de los datos por los resultados del método analítico que se observa en la tabla 18.

Tabla 18: Pruebas de Normalidad para los residuos. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,930439	0,273055

En la tabla 18 se observa la prueba de Shapiro-Wilk. Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor o igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que RESIDUOS proviene de una distribución normal con 95 % de confianza.

Igualdad de varianza:

En la figura 20 se muestra la gráfica de residuo vs predicho del diseño. Esta gráfica despliega los residuos versus los valores predichos de Masa de HTP removida. Cualquier patrón no aleatorio podría indicar que el modelo seleccionado no describe adecuadamente los datos observados. Esta gráfica es especialmente buena para mostrar heteroscedasticidad, en la cual, la variabilidad de los residuos cambia conforme cambian los valores de la variable dependiente.

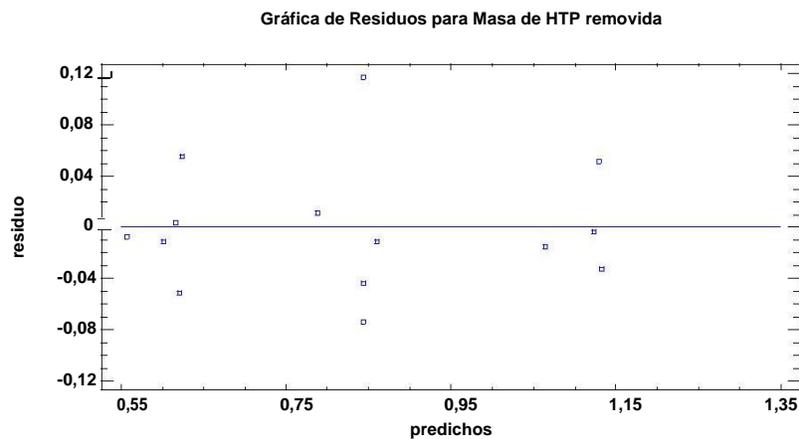


Figura 20: Gráfica de Residuos vs. Predicho. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede apreciar los puntos se distribuyen a lo largo de toda la línea horizontal sin ningún patrón contundente. Por tal razón podemos afirmar que los residuos del modelo del diseño cumplen con el supuesto de igualdad de varianza (heteroscedasticidad).

Independencia:

En la figura 21 se observa la gráfica de residuos vs número de ejecución. Cualquier patrón no aleatorio podría indicar correlación serial en los datos, si el orden en las filas corresponde al orden en que los datos fueron recolectados.

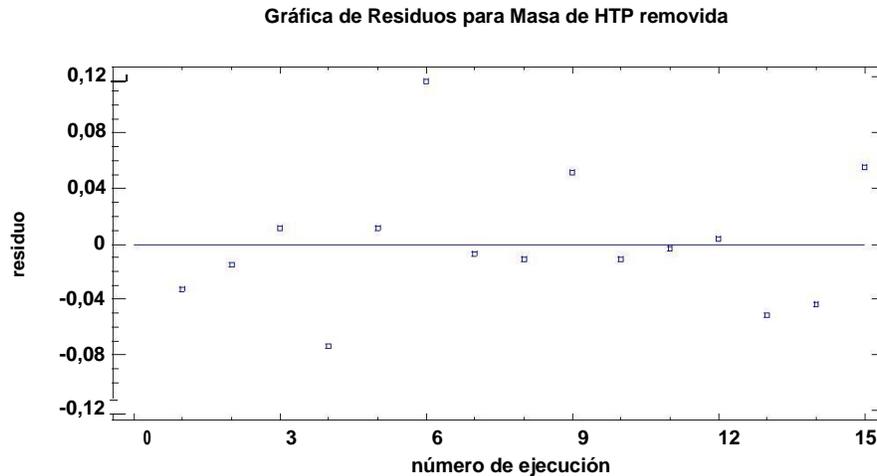


Figura 21: Gráfica de Residuos vs número de ejecución. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede apreciar no existe ningún patrón diferente a una dispersión aleatoria, por tanto, se cumple el supuesto de independencia. Esta observación se corroboró con la prueba analítica de Durbin – Watson, en la cual su valor-P mostrado en los estadísticos del modelo es de 0,4136, es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 95 %. Por lo que queda corroborado que se cumple el supuesto de normalidad.

Concentración de HTP final:

Para el análisis de la variable de respuesta concentración de HTP final, se procedió de forma análoga al va variable de respuesta anterior. Los resultados de la misma se muestran en el anexo 46.

En la tabla 19 se observan los coeficientes de regresión del modelo ajustado de la ecuación 13, el cual describe el comportamiento de la concentración de HTP final en función de los efectos del ANOVA mejorado.

Tabla 19: Coeficientes de regresión para concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	75587,0

A: Concentración de HTP inicial	2,09287
B: % de texturizante	-5733,09
C: % de humedad	-6214,54
AA	-0,0000304062
BB	99,0312
BC	166,244
CC	94,175

$$HTP_{t=240} = 75587 + 2,09287 \cdot X_1 - 5733,09 \cdot X_2 - 6214,54 \cdot X_3 - 3,04062 \cdot 10^4 + 99,0312 \cdot X_1^2 + 166,244 \cdot X_2^2 + 94,175 \cdot X_3^2 \quad (13)$$

Ecuación 13: Modelo matemático ajustado que describe el comportamiento de la variable de respuesta en función de los efectos del ANOVA mejorado. Fuente: Elaboración propia, salida del soft ware Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Donde:

$HTP_{t=240}$: concentración de HTP final (mg/kg).

$X_1 = A$: concentración inicial de HTP (mg/kg).

$X_2 = B$: % de texturizante.

$X_3 = C$: % de humedad.

Estadísticos del modelo:

$$R^2 = 86,41 \%$$

$$R^2_{aj} = 72,81 \%$$

Error estándar del est. = 1752,26.

Error absoluto medio = 848,533.

Estadístico Durbin-Watson = 1,99044 (P=0,3942).

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 86,41 % de la variabilidad en Masa de HTP removida. El estadístico R^2_{aj} , que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 72,81 % mayor que el 70 % requerido. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1752,26. El error medio absoluto (MAE) de 848,533 es el valor promedio de los residuos. El

estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 95,0 %.

En el gráfico de malla de superficie de respuesta del anexo 47, se observó como el color verde – azul, que representa la región con menores concentraciones de HTP (hasta 5 400 mg/kg), se encuentra en la región de menor concentración inicial de HTP, mayor % de humedad y menor % de texturizante.

Los modelos obtenidos son modelos empíricos (modelos de caja negra) los cuales proporciona poca o ninguna información respecto a los mecanismos que rigen el proceso. Son una descripción aproximada del comportamiento de este en forma de una expresión algebraica. Su mayor limitación radica en que no brindan información acerca de los mecanismos que rigen el proceso, por lo que solo son válidos dentro de los rangos de operación de los factores estudiados, no siendo posible su aplicación fuera de estos límites (Guerra & Sevilla, 1987).

Optimización simultánea de las variables de respuesta:

Este procedimiento ayudó a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Lo hace maximizando la función de deseabilidad. Las características de la optimización simultánea que se realizó se muestran en la tabla 20.

Tabla 20: Características de la optimización simultánea. Fuente: Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Respuesta	Deseabilidad	Deseabilidad	Meta	Pesos	Pesos	Impacto
	Baja	Alta		Primero	Segundo	
Masa de HTP removida	0,55	1,18	Maximizar	1,0	-	3,0
Concentración de HTP final	4048,5	16232,5	8000,0	1,0	1,0	3,0

En el anexo 48 muestra la función deseabilidad evaluada en cada punto del diseño. En el mismo se observó entre los puntos del diseño que la deseabilidad máxima se alcanza en el Tratamiento 1.

La tabla 21 muestra la combinación de niveles de factores que maximiza la función de deseabilidad en la región limitada por los máximos y mínimos obtenidos para cada variable de respuesta. En el anexo 49 se muestra la salida de la función de deseabilidad.

Tabla 21: Optimización de la función Deseabilidad. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración HTP inicial (mg/kg)	21848,0	39326,0	39278,0
% de texturizante	4,0	12,0	6,44611
% de humedad	20,0	30,0	25,9464

El valor óptimo de la función de deseabilidad que se encuentra siempre entre 0 y 1 fue de 1. En la tabla 21 se pueden observar los niveles de los 3 factores estudiados para alcanzar dicho óptimo. Para estos niveles se alcanzó una masa de HTP removida de 1,19 kg y una concentración de HTP final de 8 000 mg/kg cumpliendo de esta forma las dos metas propuestas para el diseño.

La figura 22 muestra la gráfica de estimación de deseabilidad en función de concentración HTP y % de texturizante, manteniendo el % de humedad en su nivel óptimo.

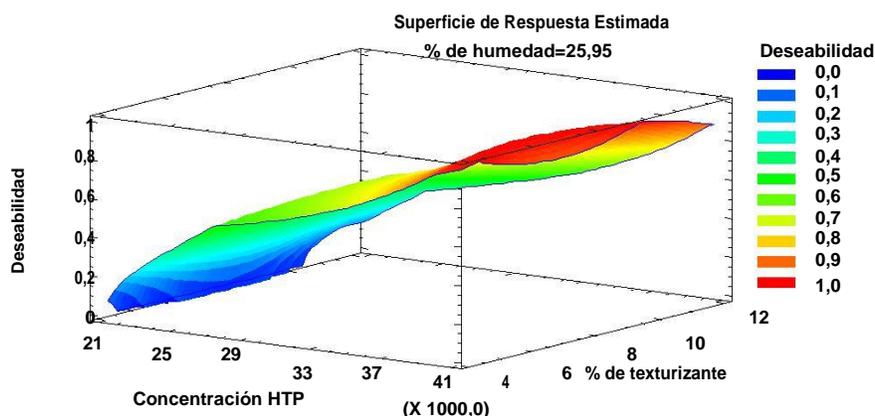


Figura 22: Superficie de Respuesta Estimada para la función deseabilidad manteniendo el % de humedad en su nivel óptimo. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

En la figura 23 se muestra la gráfica de Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada para deseabilidad en función de concentración HTP y % de texturizante, manteniendo el %

de humedad en su nivel óptimo. Cada línea de contorno representa combinaciones de Concentración HTP y % de texturizante las cuales dan el valor seleccionado de deseabilidad. Los otros factores se mantienen constantes.

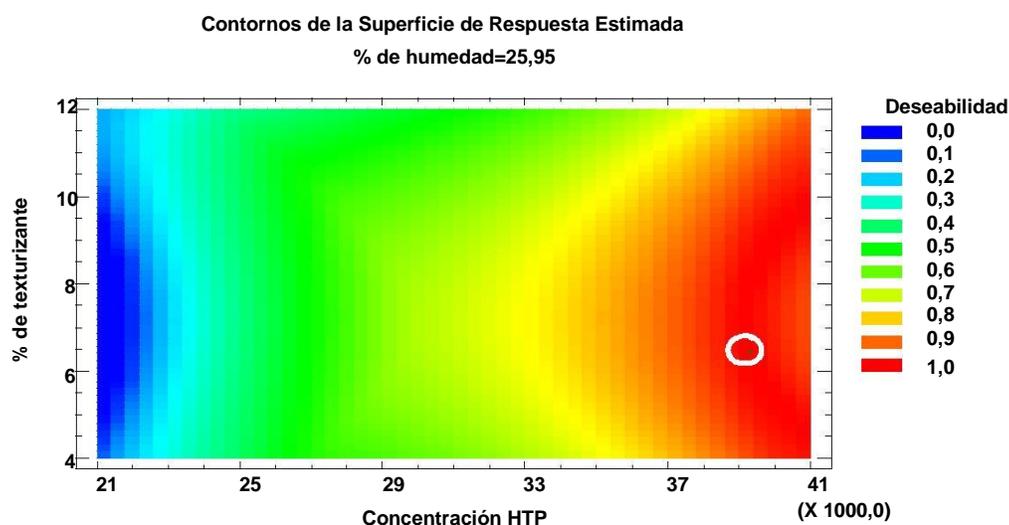


Figura 23: Contorno de la Superficie de Respuesta Estimada para la función deseabilidad. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

La cruz muestra el óptimo para los dos factores analizados.

Las gráficas de superficies de las figuras 22 y 23 corroboraron los valores de los factores estudiados de la tabla 21, al coincidir que para lograr el óptimo de deseabilidad los niveles de los factores tienen que tomar los siguientes valores: concentración inicial de HTP 39 278 mg/kg, % de texturizante 6,45 % y % de humedad 25,95 %. No obstante, se confirmó que la función deseabilidad se mantiene el entorno del valor máximo para valores de % de texturizante entre 6 y 10 %; manteniendo los otros dos factores estudiados en sus valores óptimos.

La gráfica de la figura 24 muestra las funciones de contorno para cada una de las variables de respuesta.

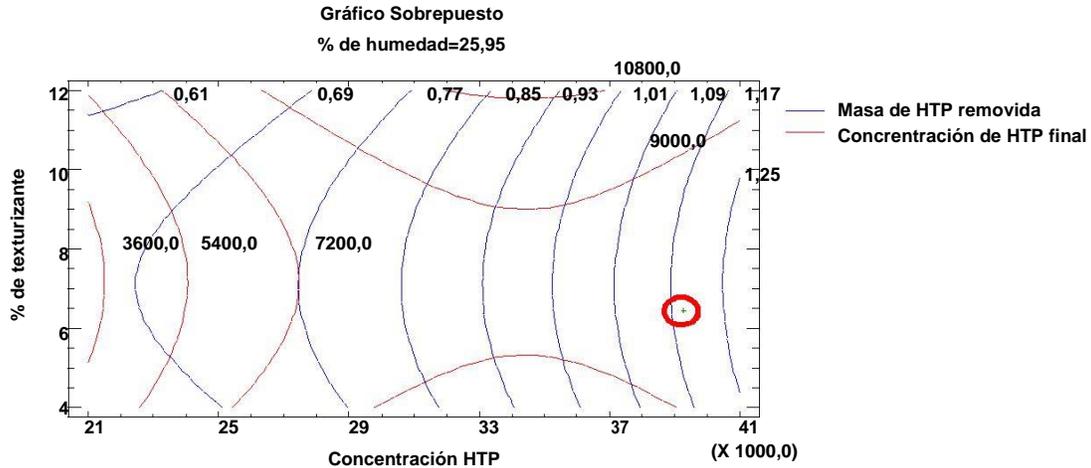


Figura 24: Gráfico Superpuesto de las dos Superficies de Respuesta. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

La cruz de la gráfica muestra el punto óptimo de la función deseabilidad para el factor % humedad en su nivel óptimo.

Del mismo modo se verificó que la masa de HTP removida se mantuvo en el rango de la solución de compromiso u óptimo simultáneo para valores de % de texturizante entre 6 y 10 %; manteniendo los otros dos factores estudiados en sus valores óptimos. Asimismo, para estas condiciones se verificó que el valor de concentración de HTP final se mantiene en el entorno del valor deseado.

3.8 Evaluación ecotoxicológica.

3.8.1 Patrón animal empleando *Eisenia foetida*.

Se colocaron 5 lombrices en cada frasco debido a la poca cantidad de muestra. Las muestras tuvieron en cada tratamiento igual gramajes según protocolo y se le adiciónó por igual 20 g de humus, como alimento inicial de las lombrices.

En el anexo 50 se muestra el número de organismos vivos que se depositaron inicialmente en la cada muestra y a los sobrevivientes a los 21 días de estar expuesto en los ensayos.

En la figura 25 se muestra el número de organismos vivos por ensayo a los 28 días de exposición a las muestras de biopilas .

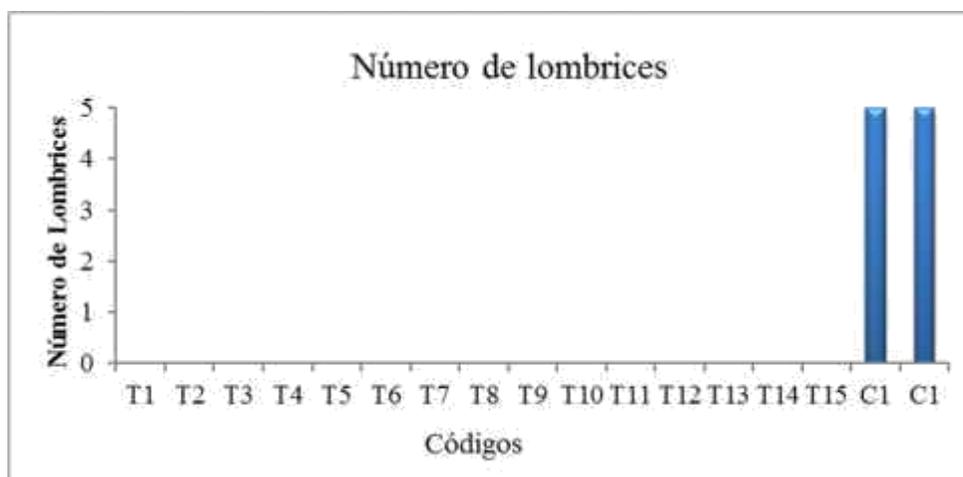


Figura 25: Número de organismos vivos por ensayo a los 28 días de exposición a las muestras de biopilas. Fuente: (Valle, 2020b).

En figura 25 se pudo observar que los organismos no sobrevivieron en ninguno de los 15 tratamientos, debido a una concentración alta de HTP en toda la muestra. Los testigos cumplieron la prueba de calidad del ensayo pues se obtuvo un 0 % de muertes en los controles por lo que el ensayo es válido.

3.8.2 Patrón vegetal empleando *Lactuca sativa*.

En el anexo 51 se muestran un libro de cálculo de Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016) con los datos primarios y los cálculos realizados. En la tabla 22 se muestran los resultados de la fitotoxicidad de cada uno de los tratamientos (Tn) y los controles (Cn)

Tabla 22: Resultados de la fitotoxicidad. Fuente: (Valle, 2020a).

Código	% de Semillas Germinadas	Promedio de elongación de la radícula (cm)	IG (%)	Escala de evaluación
T1	50	0,40	7,14	Severa
T2	0	0,00	0,00	Severa
T3	0	0,40	0,00	Severa
T4	0	1,20	0,00	Severa
T5	0	0,60	0,00	Severa
T6	0	0,60	0,00	Severa
T7	0	0,30	0,00	Severa
T8	0	0,71	0,00	Severa
T9	0	0,65	0,00	Severa
T10	0	0,35	0,00	Severa
T11	0	0,50	0,00	Severa
T12	0	0,60	0,00	Severa
T13	0	0,60	0,00	Severa

T14	0	0,72	0,00	Severa
T15	0	2,80	0,00	Severa
C1	100	1,52	100,00	Leve
C2	90	0,86	50,92	Leve

Se tomó la muestra C1 para los cálculos del IG, pues es el que cumple con todos los parámetros de calidad de la prueba. Los resultados de germinación fueron muy negativos pues solamente se reportó germinación en el tratamiento 1 (T1).

La elongación radicular se observa en las figuras 26, además no se observaron durante el ensayo otros efectos tóxicos en las plántulas.



Figura 26: Elongación de la radícula. Fuente: (Valle, 2020a).

Ambos ensayos confirmaron que, a pesar de la remoción de contaminantes, la calidad ecotoxicológica del residuo tratado mostró que tiene niveles de toxicidad severa, por lo que no debe ser dispuesto en suelos con fines agrícolas. Se corroboraron los resultados obtenidos por González (2019).

3.9 Manejo de las unidades experimentales.

En la tabla 23 se muestra la caracterización cualitativa del manejo de las unidades experimentales (tratamientos), teniendo en cuenta la manipulación, formación de grumos, degradación del texturizante, retención de humedad y generación de lixiviados.

Tabla 23: Caracterización cualitativa del manejo de las unidades experimentales.

Fuente: Elaboración propia.

Tratamiento	Caracterización cualitativa
1	Fácil manipulación . Poca formación y trituración fácil de grumos. Baja degradación del texturizante bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. No se generaron lixiviados.
2	Fácil manipulación. Poca formación y trituración fácil de grumos. Alta degradación del bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. No se generaron lixiviados.
3	Fácil manipulación. Poca formación y fácil trituración de grumos. Alta degradación del bagazo a pesar de estar en su nivel alto. Buena retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan frecuentemente en el valor deseado. No se generaron lixiviados.
4	Fácil manipulación. Poca formación y trituración fácil de grumos. Alta degradación del bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. No se generaron lixiviados.
5	Fácil manipulación. Poca formación y trituración fácil de grumos. Alta degradación del texturizante bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. No se generaron lixiviados.
6	Fácil manipulación. No se formaron grumos. Alta degradación del bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. No se generaron lixiviados.
7	Fácil manipulación . Baja degradación del texturizante bagazo. Mala retención de humedad organoléptica. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. Alternó periodos secos y periodos con lixiviados.
8	Fácil manipulación. Baja degradación del texturizante bagazo. Buena retención de humedad organolépticas. No se generaron lixiviados.
9	Difícil manipulación. Se formaron grumos de alta cohesión y difícil trituración. Mala retención de humedad . Se generaron muchos lixiviados.
10	Se generaron grumos de alta cohesión y difícil trituración. Mucha degradación del texturizante bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. No se generaron lixiviados.
11	Difícil manipulación. Se formó una mezcla de alta cohesión pastosa . Alta degradación del texturizante bagazo. Poca retención de humedad organoléptica manteniéndose con encharcamientos y anaerobiosis. Se generaron muchos lixiviados.
12	Fácil manipulación . No se formaron grumos. Alta degradación del texturizante bagazo. Buena retención de humedad organoléptica. No se generaron lixiviados.
13	Fácil manipulación. Poca formación y trituración fácil de grumos. Alta degradación del bagazo. Buena retención de humedad organoléptica, pero se reseca. Los resultados analíticos de humedad se reportan por debajo del valor deseado. No se generaron lixiviados.
14	Difícil manipulación. Se formó una mezcla de alta cohesión y pastosa. Alta degradación del texturizante bagazo. Poca retención de humedad, s e mantuvo con

	encharcamiento, aunque en verano se estabiliza en la humedad deseada, no se encharcaba, esto pudo ser por la evaporación. Se generaron muchos lixiviados.
15	Difícil manipulación. Mucha formación de grumos. Baja degradación del texturizante bagazo. Poca retención de humedad, saturándose de agua antes de alcanzar la humedad requerida formando encharcamiento permanente. Se generaron lixiviados permanentemente.

Teniendo en cuenta la caracterización cualitativa de los 15 tratamientos descrita en la tabla anterior se observó un comportamiento diferenciado, en correspondencia con los niveles de los factores estudiados.

Las unidades experimentales que presentaron mejores comportamientos desde el punto de vista del manejo atendiendo a la manipulación, retención de humedad y generación de lixiviados fueron las que tuvieron el % de texturizante en su nivel medio (0) o alto (+1) y el % de humedad en el nivel bajo (-1) o medio (0). Las unidades experimentales con el % de texturizante en su nivel bajo (-1) y el % de humedad en su nivel alto (+1) mostraron un difícil manejo, debido a la mala manipulación, poca retención de humedad y generación de lixiviados.

Por su parte la concentración de HTP tuvo una apreciable influencia en la formación de grumos, en los tratamientos con mayor concentración de HTP la formación de grumos se hizo mayor y viceversa.

3.10 Selección de los valores de las variables de operación a utilizar en el escalado de la ecotecnología de biopila.

A partir de los resultados discutidos en los acápites anteriores la propuesta de los valores de las variables de operación son las siguientes:

1. Concentración inicial de HTP: 39 278 mg/kg
2. % de texturizante: 8 %
3. % de humedad: 25 %

Con relación a la decisión del % de texturizante se sustentó en que la función deseabilidad se mantiene en el entorno del valor máximo para valores de % de texturizante entre 6 y 10 %; manteniendo los otros dos factores estudiados en sus valores óptimos. Del mismo modo se verificó que la masa de HTP removida se mantuvo en el rango de la solución de

compromiso u óptimo simultáneo. Asimismo, para estas condiciones se verificó que el valor de concentración de HTP final se mantuvo en el entorno del valor deseado.

La concentración de HTP final obtenida para los valores de las variables de operación seleccionadas, a partir del modelo ajustado de la variable de respuesta concentración de HTP final, fue de 8 099,19 mg/kg. Se cumple con la norma de disposición final (ONN, 2017), teniendo en cuenta intervalos de incertidumbre del método de ensayo y la propia del modelo ajustado.

Desde el punto de vista ecotoxicológico a pesar de la remoción de contaminantes, la calidad ecotoxicológica del residuo tratado confirmó que tiene niveles de toxicidad severa.

Desde el punto de vista del manejo, aunque los valores de las variables de operación propuestos no se corresponden con ninguna de las combinaciones de los tratamientos evaluados en el diseño de experimento, se espera que tenga un comportamiento favorable a partir de los valores de humedad y % de texturizante a utilizar, cuya influencia sobre el manejo fue discutida en el acápite 3.9.

3.11 Conclusiones parciales.

1. Se validó la pertinencia del procedimiento metodológico, protocolos y herramientas ingenieriles aplicadas en la investigación.
2. Las mayores masas de HTP removida se obtuvieron en la región definida por el nivel alto de concentración inicial de HTP y los niveles del bajo al alto de los factores % de texturizante y humedad, lo que confirma la influencia de la interacción entre estas dos últimas variables.
3. El coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) del modelo de la variable de respuesta masa de HTP removida explica el 91,07 % de la variabilidad de la respuesta; satisfactorio para fines de predicción donde se recomienda que sea de al menos 70 %. Los factores concentración inicial de HTP y la interacción entre los factores % de texturizante y humedad fueron los de mayor incidencia en la variabilidad de la respuesta.
4. Las menores concentraciones de HTP final (hasta 5 400 mg/kg) se encuentra en la región definida por el nivel alto del factor % de humedad y los niveles bajos de los factores concentración inicial de HTP y % de texturizante.

5. El coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) del modelo de la variable de respuesta concentración de HTP final explica el 72,81 % de la variabilidad de la respuesta; satisfactorio para fines de predicción donde se recomienda que sea de al menos 70 %. Los factores concentración inicial de HTP y la interacción entre los factores % de texturizante y humedad fueron los de mayor incidencia en la variabilidad de la respuesta.
6. La solución de compromiso u óptimo simultáneo se obtuvo para una concentración inicial de HTP de 39 278 mg/kg, un % de texturizante de 6,45 % y un % de humedad de 25,95 %. Valores que permitieron maximizar la masa de HTP removida y al mismo tiempo mantener una concentración de HTP final de 8 000 mg/kg, inferior a la norma de disposición final. Asimismo, se verificó que la masa de HTP removida se mantuvo en el rango de la solución de compromiso u óptimo simultáneo para valores de % de texturizante entre 6 y 10 %; manteniendo los otros dos factores estudiados en sus valores óptimos. Para estas condiciones se verificó que el valor de concentración de HTP final se mantuvo en el entorno del valor deseado.
7. La calidad ecotoxicológica del residuo tratado confirmó que tiene niveles de toxicidad severa, por lo que no debe ser dispuestos en suelos con fines agrícolas.
8. Las unidades experimentales que presentaron mejores comportamientos desde el punto de vista del manejo fueron las que tuvieron el % de texturizante en su nivel medio (0) o alto (+1) y el % de humedad en el nivel bajo (-1) o medio (0). Asimismo, las que tuvieron el % de texturizante y humedad en su nivel bajo (-1) y alto (+1) respectivamente fueron más difíciles de manejar, debido a la mala manipulación, poca retención de humedad y generación de lixiviados.
9. Se propuso para el escalado de la ecotecnología que los valores de las variables de operación sean: concentración inicial de HTP de 39 278 mg/kg, 8 % de texturizante y 25 % de humedad. Se comprobó que la concentración de HTP final obtenida para las variables de operación seleccionadas cumple con la norma de disposición final.

Conclusiones

Conclusiones Generales.

1. La biopila es una ecotecnología ex situ, pertinente para la biorremediación de residuos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos, mediante la bioestimulación. Entre los factores o variables de operación más investigados para mejorar su eficacia están: concentración de hidrocarburos, porcentaje de texturizante, porcentaje de humedad, y relación C:N:P:K.
2. El procedimiento metodológico diseñado y validado para la evaluación de la influencia de las variables de operación se fundamentó en los aspectos teóricos y metodológicos del desarrollo de procesos y de la ecotecnología. Fue ordenado por etapas en un diagrama heurístico y se utilizaron herramientas de investigación científica, destacándose el diseño de experimentos, balance de masa, diseño ingeniero y el análisis estadístico.
3. Las mayores masas de HTP removida en la biorremediación se obtuvieron en la región definida por el nivel alto de concentración inicial de HTP y los niveles del bajo al alto de los factores % de texturizante y humedad. Por su parte los valores menores de concentraciones de HTP final se encontraron en la región definida por el nivel alto del factor % de humedad y los niveles bajos de los factores concentración inicial de HTP y % de texturizante.
4. La solución de compromiso u óptimo simultáneo se obtuvo para una concentración inicial de HTP de 39 278 mg/kg, un % de texturizante de 6,45 % y un % de humedad de 25,95 %; no obstante, la masa de HTP removida se mantuvo en el rango de la solución de compromiso u óptimo simultáneo para valores de % de texturizante entre 6 y 10 %; manteniendo los otros dos factores estudiados en sus valores óptimos.
5. La calidad ecotoxicológica del residuo tratado confirmó que tiene niveles de toxicidad severa, por lo que no debe ser dispuestos en suelos con fines agrícolas.
6. Para el escalado de la ecotecnología se propuso que los valores de las variables de operación sean: concentración inicial de HTP de 39 278 mg/kg, 8 % de texturizante y 25 % de humedad. Se comprobó que la concentración de HTP final obtenida para las variables de operación seleccionadas cumple con la norma de disposición final.

Recomendaciones

Recomendaciones.

1. Complementar los resultados de esta investigación con los estudios microbiológicos , actualmente en proceso.
2. Continuar el proceso de desarrollo de la ecotecnología de biopilas en su etapa de escalado a nivel piloto.
3. Estudiar la taxonomía de los microorganismos presentes en la biorremediación en la próxima etapa de la investigación.
4. Continuar los estudios de calidad ecotoxicológica del residual tratado en la próxima etapa de la investigación.
5. Socializar los resultados de la investigación en diferentes espacios científicos, académicos y empresariales.

Bibliografía

Bibliografía.

- Abduelbaset, M., Essabre, A., Aydinlik, P., Williams, & Williams, N. (2019). Bioaugmentation and Biostimulation of Total Petroleum Hydrocarbon Degradation in a Petroleum-contaminated Soil with Fungi Isolated from Olive Oil Effluent. *Water Air Soil Pollut*, (76), 230.
https://www.academia.edu/40077048/Bioaugmentation_and_Biostimulation_of_Total_Petroleum_Hydrocarbon_Degradation_in_a_Petroleum-contaminated_Soil_with_Fungi_Isolated_from_Olive_Oil_Effluent
doi:<https://doi.org/10.1007/s11270-019-4127-8>
- Abdul, M., & Webb, C. (2017). Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 4(1), 1-25.
https://www.researchgate.net/publication/320489032_Design_Aspects_of_Solid_State_Fermentation_as_Applied_to_Microbial_Bioprocessing
- Abioye, P., Aziz, A., & Agamuthu, P. (2010). Enhanced biodegradation of used engine oil in soil amended with organic wastes. *Water, Air, Soil Pollution*, (209), 173-179.
https://www.researchgate.net/publication/226945238_Enhanced_Biodegradation_of_Used_Engine_Oil_in_Soil_Amended_with_Organic_Wastes
- Alcalde, A. M. A. (2018). *Influencia de las sales inorgánicas en la optimización de la producción de ramnolípidos por Pseudomonas aeruginosa 6K-11 empleando la metodología de superficie de respuesta*. (Tesis de Grado), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/7890>
- Alonso, R. (2012). *Proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de Grado), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. Retrieved from https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2012/hdl_2072_206396/PFC_RaquelAlonsoRiesco.pdf
- AMA. (2016). *Programa de Ciencia, Tecnología e Innovación de Interés Nacional: "Uso Sostenible de los Componentes de la Diversidad Biológica en Cuba"*. . La Habana. Cuba: Agencia de Medio Ambiente (AMA). Ministerio de Ciencia Tecnología y

- Medio Ambiente (CITMA) Retrieved from <http://repositorio.geotech.cu/jspui/bitstream/1234/4124/3/Programa%20Uso%20sostenible%20de%20los%20componentes%20de%20la%20Diversidad%20Biol%C3%B3gica%20en%20Cuba.pdf>.
- Barrios, Y. (2011). Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotecnología Aplicada*, 28 (2), 69-76. <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v28n2/bta01211.pdf>
- BATTELLE, & NFESC. (1996). *Biopile design and construction manual*. Columbus, Ohio: Battelle Environmental Restoration Department and Naval Facilities Engineering Service Center (NFESC) Retrieved from <https://clu-in.org/download/techfocus/bio/Biopile-design-and-construction-1996-tm-2189.pdf>.
- Behrentz, E., & Giraldo, E. (1999). Modelación a escala del proceso de compostaje aerobio, en pila estática y con aireación forzada. Desarrollo teórico e implementación de laboratorio. *Revista colombiana de Biotecnología*, 2(2), 51-59. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30052/30251>
- Bermúdez, J., Castro, D., Gutiérrez, O., & Poma, J. (2014). Diagnóstico del sistema de tratamiento de residuos líquidos oleosos de las Centrales Eléctricas de fuel oil de Cienfuegos. Informe Técnico. Cienfuegos Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos.
- Bosco, F., Casale, A., Chiampo, F., & Godio, A. (2019). Removal of Diesel Oil in Soil Microcosms and Implication for Geophysical Monitoring. *11*(8). <https://www.mdpi.com/2073-4441/11/8/1661> doi:10.3390/w11081661
- Bosco, F., Casale, A., Mazzarino, I., Godio, A., Ruffino, B., Mollea, C., & Chiampo, F. (2019). Microcosm evaluation of bioaugmentation and biostimulation efficacy on diesel-contaminated soil. <https://doi.org/10.1002/jctb.5966> doi:10.1002/jctb.5966
- Bosco, F., & Mollea, C. (2019). Mycoremediation in Soil Chapter in Book: Environmental Chemistry and Recent Pollution Control Approaches. IntechOpen Limited, London. Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/environmental-chemistry-and-recent-pollution-control-approaches/mycoremediation-in-soil>. doi: 10.5772/intechopen.84777

- Braibant, C. W. (2004). *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados*. (Tesis de Grado), Instituto Tecnológico de Costa Rica., Cartago, Costa Rica. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2238/206>
- Buendía, H. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles. Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 15 (30). <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/4101>
- Casals, E., Rabassa, D., Viera, O., Gutiérrez, O., & Castro, D. (2020). Comportamiento de factores abióticos en la biorremediación de residuos petrolizados mediante biopilas a escala semi - piloto. *Revista Centro Azúcar* 47 (Enero - Marzo 2020), 12. <http://centrozucar.uclv.edu.cu>
- Castro, D., Leyva, D., Santana, M., González, A., & Rodríguez, T. (2013). Management by process as clean alternative for bioremediation project management. *Management of Technology- Step to Sustainable Production.*, 67. <http://www.researchgate.net/publication/339443297MANAGEMENTBYPROCESSASCLEANALTERNATIVEFORBIORREMIATIONPROJECTMANAGEMENT>
- Ccolque, Y., & Vargas, A. (2017). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) mediante el método de biopilas con dos tipos de sustrato (tierra y abonos orgánicos)*. (Tesis de Grado), Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú. Retrieved from <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/6745>
- CDN. (2018). *Proyecto de Directiva 1 del Presidente del Consejo de Defensa Nacional para la reducción de desastres*. La Habana, Cuba: Consejo de Defensa Nacional (CDN).
- CEAC. (2017a). Procedimiento para la determinación de Grasas y Aceites en suelos y sedimentos. Método gravimétrico L -SA-517. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).

- CEAC. (2017b). Procedimiento para la determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo en suelos y sedimentos. Método gravimétrico L -SA-517. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- CEAC. (2018a). Procedimiento para la determinación de elementos en sedimentos y suelos espectrometría de fluorescencia de Rayos x dispersivo por energía (EDXRF). L-SA-419. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- CEAC. (2018b). Procedimiento para la determinación del contenido de materia orgánica, carbono orgánico y carbonato de calcio por pérdidas por ignición en sedimentos y suelos. L-SA-154. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- CEINPET. (2020). Análisis de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos. La Habana, Cuba: Centro de Investigación del Petróleo (CEINPET).
- CEPAL. (2016). *Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: Una oportunidad para América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile: Comisión Económica para América Latina y el Caribe. Retrieved from www.un.org/sustainabledevelopment/es.
- CITMA. (2015). *Estrategia Ambiental Nacional 2016-2020*. La Habana, Cuba: Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) Retrieved from <http://repositorio.geotech.cu/jspui/bitstream/1234/2727/1/Estrategia%20Ambiental%20Nacional%202016-2020.pdf>.
- Cocarta, D. M., Stoian, M. A., & Karademir, A. (2017). Crude Oil Contaminated Sites: Evaluation by Using Risk Assessment Approach. 9, 16. www.mdpi.com/journal/sustainability/doi:10.3390/su9081365
- Chardoul, N., O'Brien, K., Clawson, B., & Fletcher, M. (2015). *Compost Operator Guidebook. Best management practices for commercial scale composting operations*. Retrieved from https://www.michigan.gov/documents/deq/deq-oea-compostoperatorguidebook_488399_7.pdf
- De Oliveira, S. J. V., Alves Ferreira, Y. L., de Souza Silva, L. L., de Lacerda Buarque de Lyra, I. M., Brandão Palácio, S., & Ferro Cavalcanti, I. M. (2018). Use of bioremediation for the removal of petroleum hydrocarbons from the soil: an overview. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*, 3 (5), 1831-1838. <https://ijeab.com/detail/use-of-bioremediation-for-the->

[removal-of-petroleum-hydrocarbons-from-the-soil-an-overview/](#)

doi:10.22161/ijeab/3.5.35

- Dzionic, A., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28-36. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
- ENIA. (2018). Informe de resultados de ensayos de suelos. Informe Técnico *Empresa Nacional de Investigaciones Aplicadas (ENIA)*. Cienfuegos, Cuba.
- EPA. (2005a). *Guidelines. Soil bioremediation*. Washington DC: United States Environmental Protection Agency (EPA) Retrieved from https://www.epa.sa.gov.au/files/8372_guide_soil.pdf.
- EPA. (2005b). *Road map to understanding innovative technology options for brownfields investigation and cleanup (EPA-542-B-05-001)*. Washington DC: United States Environmental Protection Agency (EPA) Retrieved from <https://clu-in.org/download/misc/roadmap4.pdf>.
- EPA. (2007). *Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report (EPA-542-R-07-01)*. Washington DC: United States Environmental Protection Agency (EPA) Retrieved from https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/asr12_full_document.pdf.
- EPA. (2012). *A Citizen's Guide to Bioremediation (EPA 542-F-12-003)*. Washington D.C: United States Environmental Protection Agency (EPA) Retrieved from <http://clu-in.org/products/citguide/>.
- EPA. (2017). *How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites. A Guide For Corrective Action Plan Reviewers. Chapter IV Biopiles (EPA 510-B-17-003). Land And Emergency Management 5401R* Washington DC: United States Environmental Protection Agency (EPA) Retrieved from https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/tum_ch4.pdf.
- Ercoli, E. (1998). Curso latinoamericano de especialización en técnicas de remediación ambiental. Tratamientos biológicos., 31. https://nanopdf.com/download/tema-11-tratamientos-biologicos-dr-eduardo_pdf

- Ercoli, E. (2008). Biorremediación de suelos: Desde el concepto a su aplicación. Foro Internacional Supervisión y Fiscalización Ambiental en el sector hidrocarburos. 55. <http://www.osinerg.gob.pe/newweb/pages/GFH/ForoUMAL/tema5.pdf>
- Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P., & Schroeder, E. D. (1998). *Bioremediation principles*. United States of America: McGraw-Hill International Editions.
- Fabelo, J. A. (2017). Propuesta de metodología para la recuperación de suelos contaminados. *Centro Azúcar*, 44 (Enero - Marzo 2017). <http://centroazucar.uclv.edu.cu>
- Fernández, L. C., Rojas, N. G., Roldán, T. G., Ramírez, M. E., Zegarra, H. G., Uribe, R., . . . Arce, J. M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados* (pp.184). Retrieved from <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CG008215.pdf>
- Figueras, A., Tamayo, E., Tintoré, J., Sánchez, F., Murado, M., Rodríguez, E., . . . Albaigés, J. (2005). *Las lecciones de la catástrofe del Prestige: Biorremediación, pseudoproblemas, problemas y una experiencia* Retrieved from <https://books.google.com.cu/books?id=v9bG8y8-kusC&pg=PA123&lpg=PA123&dq=Las+lecciones+de+la+cat%C3%A1strofe+del+Prestige:+Biorremediaci%C3%B3n,+pseudoproblemas,+problemas+y+una+experiencia.&source=bl&ots=l0IAthYBOw&sig=ACfU3U2lewp1z495Sh-RXeVphr8nHJBZNA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKewjw39KvrdnpAhWjTd8KHSXnAY4Q6AEwAHoECAoQAQ>
- Flores. (2015). *Efecto del estiércol de cerdo y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburo de diésel en terrarios*. (Tesis de Grado), Universidad Nacional "Pedro Ruíz Gallo", Lambayeque, Perú. Retrieved from <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/832/BC-TES-4114.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Flores, & Alcalá. (2010). Manual de procedimientos analíticos. Laboratorio de Física de Suelos. México: Universidad Autónoma de México, Instituto de Geología, departamento de Edafología. 56. <http://www.geologia.unam.mx/igl/deptos/lfs/manualLFS.pdf>

- González, A. (2019). *Evaluación de la eficacia de la ecotecnología de biopilas para la biorremediación de residuos petrolizados a escala semipiloto utilizando diferentes texturizantes*. (Trabajo de Diploma), Universidad de Cienfuegos, Cienfuegos.
- Guerra, J., & Sevilla, E. (1987). *Introducción al análisis estadístico para procesos*. La Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación.
- Gutiérrez, Castro, D., Rabassa, D., Viera, O., & Casals, E. (2017). Identificación y diagnóstico tecnológico de los sistemas de tratamiento y disposición final de aguas residuales de inmuebles e instalaciones de la Empresa Eléctrica Cienfuegos en los municipios de Cienfuegos, Cumanayagua y Cruces. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Gutiérrez, Castro, D., Rabassa, D., Viera, O., & Casals, E. (2018). Identificación y diagnóstico tecnológico de los sistemas de tratamiento y disposición final de aguas residuales de inmuebles e instalaciones de la Empresa Eléctrica Cienfuegos en los municipios de Aguada de Pasajeros, Rodas, Lajas y Abreus. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Gutiérrez, & De la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (3ra ed.). México, DF: Mc Graw Hill.
- Gutiérrez, O., Castro, D., Poma, J., Rabassa, D., & Viera, O. (2016). Diagnóstico tecnológico de los sistemas de tratamiento de aguas residuales y de drenaje pluvial en instalaciones de la Empresa Eléctrica Cienfuegos (Talleres de Transporte automotor y transformadores). Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Harayama, S., Kasia, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* 15(3), 205-214.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.002>
- Inca, D., & Ortiz, M. (2018). *Evaluación del impacto ambiental de los residuos generados por lavadoras y lubricadoras para la propuesta técnica de una guía de manejo*. (Tesis de Grado), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10552/1/236T0411.pdf>

- INSMET. (2020). Certificado Meteorológico de datos de temperatura, humedad relativa, precipitación y viento medio de la Estación Meteorológica de la Piedra. (pp. 16). Santa Clara, Cuba: Centro Meteorológico Provincial de Villa Clara (INSMET).
- IPIECA. (2004). *Guidelines for the minimization and management of waste from oil spills*. London, Reino Unido: International Petroleum Industry Environmental Conservation Association (IPIECA) Retrieved from [http://www.cleancaribbean.org/download_pdf.cfm?cF=IPIECA%20Oil%20Spill%20Report%20Series%20\(Spanish\)&fN=Vol_12_WasteManagemt_SP_623.27KB.pdf](http://www.cleancaribbean.org/download_pdf.cfm?cF=IPIECA%20Oil%20Spill%20Report%20Series%20(Spanish)&fN=Vol_12_WasteManagemt_SP_623.27KB.pdf)
- ITOPF. (2011a). *Disposal of oil and debris. Technique Report*. London, United Kingdom: The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF) Retrieved from https://www.ukpandi.com/fileadmin/uploads/uk-pi/Knowledge_Base_-_International_Conventions/TIP%209%20Disposal%20of%20Oil%20and%20Debris.pdf.
- ITOPF. (2011b). *Effects of oil pollution on the environment. Technique Report* London, United Kingdom: The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF) Retrieved from <https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/document/tip-13-effects-of-oil-pollution-on-the-marine-environment/>
- Iturbe, R., Flores, C., Chávez, C., & Roldán, A. (2002). San eamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 3(1), 25-35. <https://www.revistaingenieria.unam.mx/numeros/2002/v03n1-04.pdf>
- Izquierdo, A. (2014). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. (Disertación Doctoral), Universitat de Barcelona, Barcelona, España. Retrieved from http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/53361/1/ARIR_TESIS.pdf
- Jiménez, Y. (2018). *Planificación del proceso de investigación -desarrollo de una ecotecnología para la biorremediación de hidrocarburos mediante QFD*. (Trabajo de Diploma), Universidad de Cienfuegos, Cienfuegos.
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V., & Dhewa, T. (2011). Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental*

Sciences, 1(6), 1079-1093.

<http://www.ipublishing.co.in/jesvol1no12010/EIJES2061.pdf>

- Laura, R. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias*. (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18082/Documento_completo.pdf?sequence=1
- LEA. (2017). Informe de ensayos de caracterización de suelos. Cienfuegos, Cuba.: Laboratorio de Ensayos Ambientales (LEA), Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- LEA. (2018). Informe de ensayos de caracterización de residuos petrolizados. Cienfuegos, Cuba: Laboratorio de Ensayos Ambientales (LEA), Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- LEA. (2020). Análisis de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos. Cienfuegos, Cuba: Laboratorio de Ensayos Ambientales (LEA), Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Martín, A. R., & Arguelles, R. I. (2002). Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburo mediante biopilas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 3(1), 25-35. <https://www.revistaingenieria.unam.mx/numeros/2002/v03n1-04.pdf>
doi:<http://dx.doi.org/10.22201/ifi.25940732e.2002.03n1.004>
- Martínez, Lam, R., Cormack, M., & Balboa, L. (2017). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. *Science of the Total Environment*, 194-203. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717304631>
- Martínez, Lo Balbo, A., Mac Cormack, W. P., & Ruberto, L. A. (2015). Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Regions Science and Technology*, 119, 61-67. <https://www.researchgate.net/publication/281067587>
- Microsoft. (2016). Microsoft Office (Version 16.0). Estados Unidos de América: Microsoft. Retrieved from www.office.microsoft.com/en-us/excel

- Ming, C., Piao, X., Zeng, G., Chunping, Y., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnological Advances*, 6(33), 745-755.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300021>
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
- Mohajeri, L., Aziz, H. A., Isa, M. H., & Zahed, M. A. (2010). Ex-situ bioremediation of crude oil in soil, a comparative kinetic analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85, 54-58. https://www.researchgate.net/publication/44799869_Ex-situ_Bioremediation_of_Crude_Oil_in_Soil_a_Comparative_Kinetic_Analysis/link/0deec5154d9769c90d000000/download
- Mohajeri, L., Aziz, H. A., Isa, M. H., & Zahed, M. A. (2013). Effect of remediation strategy on crude oil biodegradation kinetics and halflife times in shoreline sediment samples. *International Journal of Marine Sciences and Engenier*, 3(2), 99-104.
https://iranjournals.nlai.ir/article_330829_89da14a87967d2fd873dd5b6b75e4d3a.pdf
- Moliterni, E. (2016). *Biorremediación acelerada de suelos contaminados con hidrocarburos tipo diésel*. (Tesis Doctoral), Universidad de Castilla La Mancha, España. Retrieved from
<https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/8877/TESIS%20Moliterni%20Merlo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (9th ed.). Arizona State: John Wiley & Sons, Inc.
- Narciso, A., & Paucar, R. (2019). *Optimización de la obtención del colorante de la pulpa del fruto de Mangifera indica L. (mango) utilizando el método Superficie Respuesta*. (Tesis de Grado), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/10201>
- Nilanjana, D., & Preethy, C. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International, School of Biosciences and Technology, VIT University, Vellore, Tamil Nadu 632014, India*, 1-

13. <http://downloads.hindawi.com/archive/2011/941810.pdf>
doi:10.4061/2011/941810
- Núñez. (2003). *Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos*. (Tesis de Doctorado), Universidad de la Habana, La Habana.
- Núñez, Lorenzo, M., Ortiz, E., & Oramas, J. (2010). Biorremediación de la contaminación de petróleo en el mar. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, 10 (19). <http://ama.redciencia.cu/articulos/19.02.pdf>
- Ñustez, D., Paredes, D., & Cubillos, J. (2014). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería, Universidad de Zulia*, 37(1), 20-28.
<http://produccioncientificaluz.org/index.php/tecnica/article/view/6941/6930>
- ONN. (1999a). *Geotecnia. Determinación de la granulometría de los suelos (NC 20:1999)*. Norma Cubana. Ciudad de La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (1999b). *Geotecnia. Determinación del peso específico de los suelos (NC 19:1999)*. Norma Cubana. Ciudad de La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2000a). *Geotecnia. Clasificación de los suelos para o bras de transporte (NC 63:2000)*. Norma Cubana. Ciudad de La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2000b). *Geotecnia. Clasificación geotécnica de los suelos (NC 59:2000)*. Norma Cubana. Ciudad de La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2000c). *Geotecnia. Determinación del límite líquido, límite plástico e índice de plasticidad de los suelos (NC 58:2000)*. Norma Cubana. Ciudad de La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2008). *Guía para la estimación y expresión de la incertidumbre de la medición en el análisis químico. NC: TS-367: 2008*. La Habana, Cuba: Oficina Nacional de

- Normalización de Cuba (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2011). *Calidad del suelo. Determinación de la humedad. (NC 110: 2011)* La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN). Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2015a). *Calidad del suelo. Determinación del pH. (NC 2001: 2015)* . La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN). Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2015b). *Calidad del suelo. Fósforo y potasio totales. Métodos de ensayo. (NC 34: 2015)*. La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN). Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- ONN. (2017). *Manejo de Fondaje de Tanques de Almacenamiento de Petróleo y sus Derivados. (NC 819: 2017). Norma Cubana*. La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización (ONN) Retrieved from <http://www.nonline.cubaindustria.cu:81/>.
- Ordaz, J., Martínez, A., Ramos, F., Sánchez, L., Martínez, A., Tenorio, J., & Cuevas, M. (2011). Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partículas. *Multiciencias*, 11(Mayo-Agosto), 136-145. <https://www.redalyc.org/pdf/904/90419195004.pdf>
- Ortiz, Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., . . . Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente* (6), 51-60. <https://pdfs.semanticscholar.org/1002/ec30c1554a9c5c5f03eaf0bbd5e69fce6284.pdf>
- Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Ingeniería Ambiental y Sanitaria* 2(2), 40 - 49. <https://www.redalyc.org/pdf/411/41100205.pdf>
- Patricia, M. M. (2019). *Degradación de hidrocarburos con hongos micorrízicos arbusculares Rhizophagus irregularis y una cepa nativa proveniente de la Amazonía Ecuatoriana asociados a pasto RyeGrass (Lolium multiflorum)*. (Tesis de Grado), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/16939>

- PCC. (2017). Documentos del 7mo. Congreso del Partido aprobados por el III Pleno del Comité Central del PCC el 18 de mayo de 2017 y respaldados por la Asamblea Nacional del Poder Popular el 1 de junio de 2017. *Granma*. Retrieved from <http://www.granma.cu/file/pdf/gaceta/%C3%BAltimo%20PDF%2032.pdf>
- Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S., & Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Revista Salud Ambiental* 5(1), 3-20. <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/download/551/668>
- Pérez, J., Viguera, S., Zamudio, E., Rivera, N., & Calva, G. (2017). Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33 105-114. www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/download/RICA.2017.33.esp/01.09/46648
- Polyanin, & Manzhirov, A. (2007). Handbook of Mathematics for engineers and scientists. Florida, United States of America: Taylor & Francis Group. 1543. <https://igortitara.files.wordpress.com/2010/04/handbook-of-math-for-engineers-and-scientists1.pdf>
- Ponce, D. S. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de Grado), Universidad del BIO-BIO, Chile. Retrieved from <http://repositorio.ubiobio.cl/jspui/bitstream/123456789/135/3/Ponce%20Contreras%20%20Daniela.pdf>
- Prakash, V., Saxena, S., Sharma, A., Singh, S., Silva, A., & Kumar, S. (2015). Treatment of Oil Sludge Contamination by Composting. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6(3). https://www.researchgate.net/publication/274733611_Treatment_of_Oil_Sludge_Contamination_by_Composting doi:<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000284>
- Rabassa, D. (2018). *Metodología con enfoque de Producción Más Limpia, para el manejo eficaz de residuales oleosos. Caso taller de transformadores de la Empresa Eléctrica Cienfuegos*. (Tesis de Maestría en Producción Más Limpia), Universidad de Cienfuegos, Cienfuegos, Cuba.

- Riser-Robert, E. (2019). *Remediation of petroleum contaminated soils: Biological, Physical, and Chemical Processes*. Boca Raton, Florida, United States of America: September 11, 2019 by CRC Press.
- Román, P., Martínez, M., & Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor. Experiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)* Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/019/i3388s/i3388s.pdf>
- Rosabal, J. M., & Valle, M. (2010). *Hidrodinámica y Separaciones Mecánicas Tomo II*. La Habana, Cuba.
- Sánchez, J., & Rodríguez, J. (2005). Biorremediación. Fundamentos y aspectos microbiológicos. Oviedo, España: Universidad de Oviedo. 12 -16. <https://studylib.es/doc/4823291/biorremediacion-fundamentos-y-aspectos-microbiologicos>
- Shuo, S., Qiyu, L., Shuiquan, C., Wenhe, Y., Chaocheng, Z., & Hongkun, C. (2019). Optimization for microbial degradation of petroleum hydrocarbon (TPH) by *Enterobacter* sp. S-1 using response surface methodology. *Petroleum Science and Technology*, 37(7), 821-828. <https://www.researchgate.net/publication/330772084> doi:10.1080/10916466.2019.1566256
- Silva, A. (2018). *Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos en un predio ubicado en la localidad de Fontibón.*, Universidad Distrital Francisco José De Caldas, Bogotá D.C, Colombia. Retrieved from <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/13054/1/SilvaCabraBrayanAlberto2018.pdf>
- Simanca, Y. P. (2017). *Evaluación del desempeño de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos mediante el método de landfarming en la planta de tratamiento del municipio de Aguachica, Cesar.* (Tesis de Grado), Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, Ocaña, Colombia. Retrieved from <http://repositorio.ufpso.edu.co:8080/dspaceufpso/bitstream/123456789/1545/1/30048.pdf>
- Snelgrove, J. (2010). *Biopile bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils from a Sub-Arctic site.* (Thesis for the degree of Master of Engineering), McGill

- University, Montreal, Canada. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/fdb6/01ca75dd6d621962f876a4e6f89e04976ea2.pdf>
- StatPoint Technologies, Inc ., (2010). STATGRAPHICS. Centurion XVI (Version 16.1.18). Estados Unidos de Amércica.
- Thapa, B., Kumar, A., & Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8(1), 164-170. https://www.researchgate.net/publication/251565728_A_Review_On_Bioremediation_Of_Petroleum_Hydrocarbon_Contaminants_In_Soil
- Toledo, B. C. (2011). *Aplicación de procesos biológicos como medida remediación para recuperar suelos limo-arcillosos contaminados con gasolina*. (Tesis de Grado), Escuela Superior Politecnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6279/2/remediacion%20de%20suelos%20por%20procesos%20biologicos.pdf>
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de Grado), Universidad Nacional de Colombia, Medellin. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
- Tyagi, M., Da Fonseca, M. M., & De Carvalho, C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 213-214. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-010-9394-4>
- UCTB. (2017a). Informe de laboratorio de la caracterización de texturizantes. Cumanayaguas, Cienfuegos: Unidad Científica Tecnológica de Base (UCTB) Suelos Barajagua.
- UCTB. (2017b). Informe de laboratorio de la caracterización del suelo. Cumanayaguas, Cienfuegos.: Unidad Científica Tecnológica de Base (UCTB) Suelos Barajagua.
- UCTB. (2017c). Manual de métodos de ensayos analíticos para la determinación de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio en suelos, pastos y forrajes. Cumanayaguas, Cienfuegos: Unidad Científica Tecnológica de Base (UCTB) Suelos Barajagua.

- UN. (2017). *Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development* New York, United States of America: United Nations (UN) Retrieved from www.sustainabledevelopment.un.org.
- Valle, A. (2018a). Procedimiento de bioensayo de toxicidad aguda con lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Valle, A. (2018b). Procedimiento de bioensayo de toxicidad aguda por germinación y la elongación de la raíz en semillas de *Lactuca sativa* L. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Valle, A. (2020a). Evaluación de la toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L. (Lechuga). Informe Técnico. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Valle, A. (2020b). Evaluación de toxicidad aguda en organismos *Eisenia foetida* (lombriz de tierra). Informe Técnico. Cienfuegos, Cuba: Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).
- Van Deuren, J., Wang, Z., & Ledbetter, J. (1997). *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide* Retrieved from <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Varjani, S. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, (223), 276-286.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416314432?via%3Dihub> doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Velasco, J. A., & Volke, T. (2003). *El Composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México*. (1405-2849). Mexico, DF: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/539/53906604.pdf>.
- Volke, T., & Velasco, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados* Retrieved from <http://www.ecopuerto.com/Bicentenario/informes/TecnologiasRemediacion.pdf>
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Poll.* 59(October 1991), 381-400. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00211845>

Wu, G., & Coulon, F. (2015). Ex-situ bioremediation of contaminated soils with petroleum hydrocarbons. Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocol. *Pollution Mitigation and Waste Treatment Applications*, 181-194.

https://www.researchgate.net/publication/300247512_Protocol_for_Biopile_Construction_Treating_Contaminated_Soils_with_Petroleum_Hydrocarbons/citation/download

Yuniati, M. (2018). Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 118, 8.

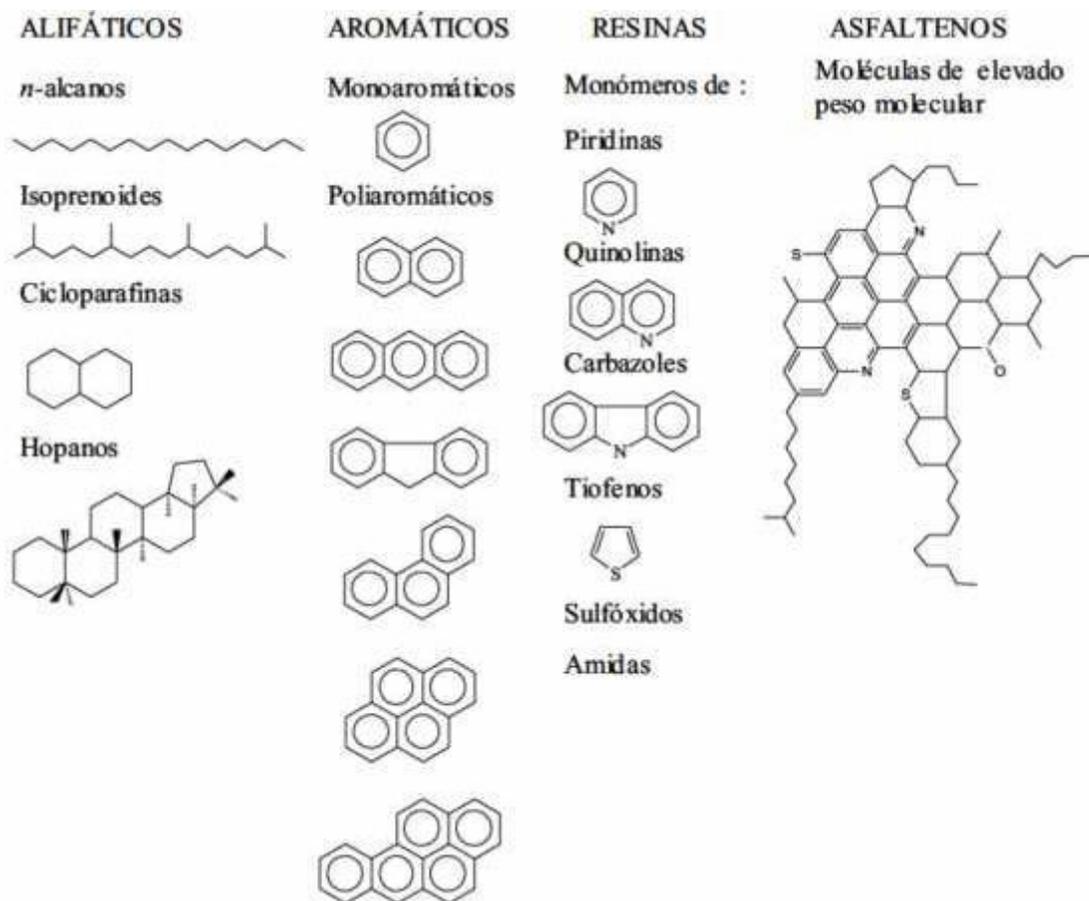
https://www.researchgate.net/publication/323348744_Bioremediation_of_petroleum-contaminated_soil_A_Review doi:doi:10.1088/1755-1315/118/1/012063

Anexos

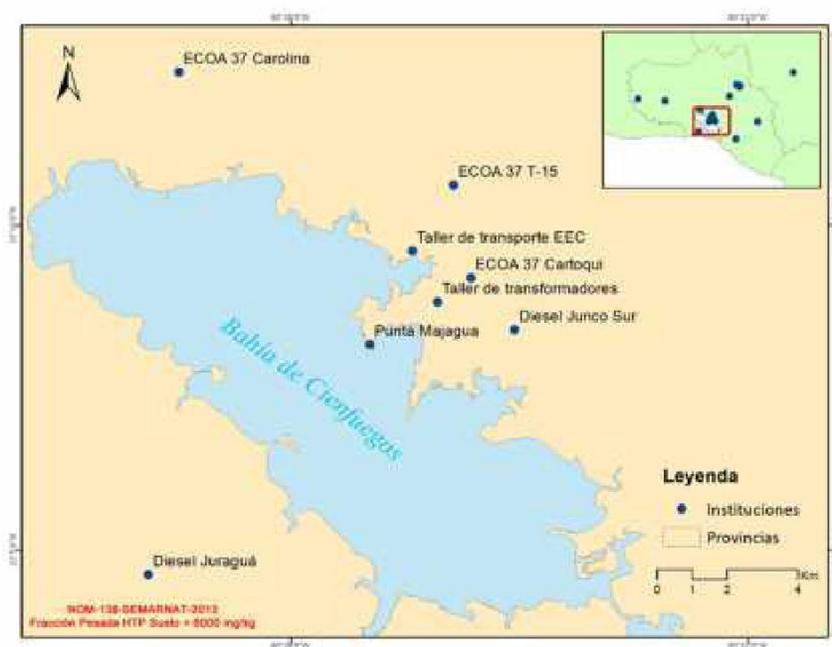
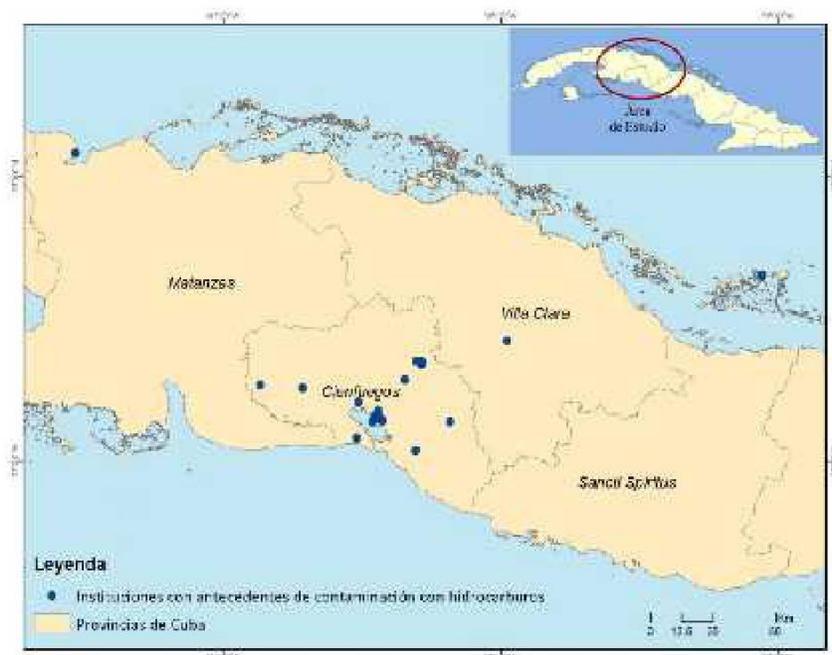
A decorative graphic element in the bottom right corner consisting of a horizontal line, a vertical line, and two small squares at their intersection.

Anexos.

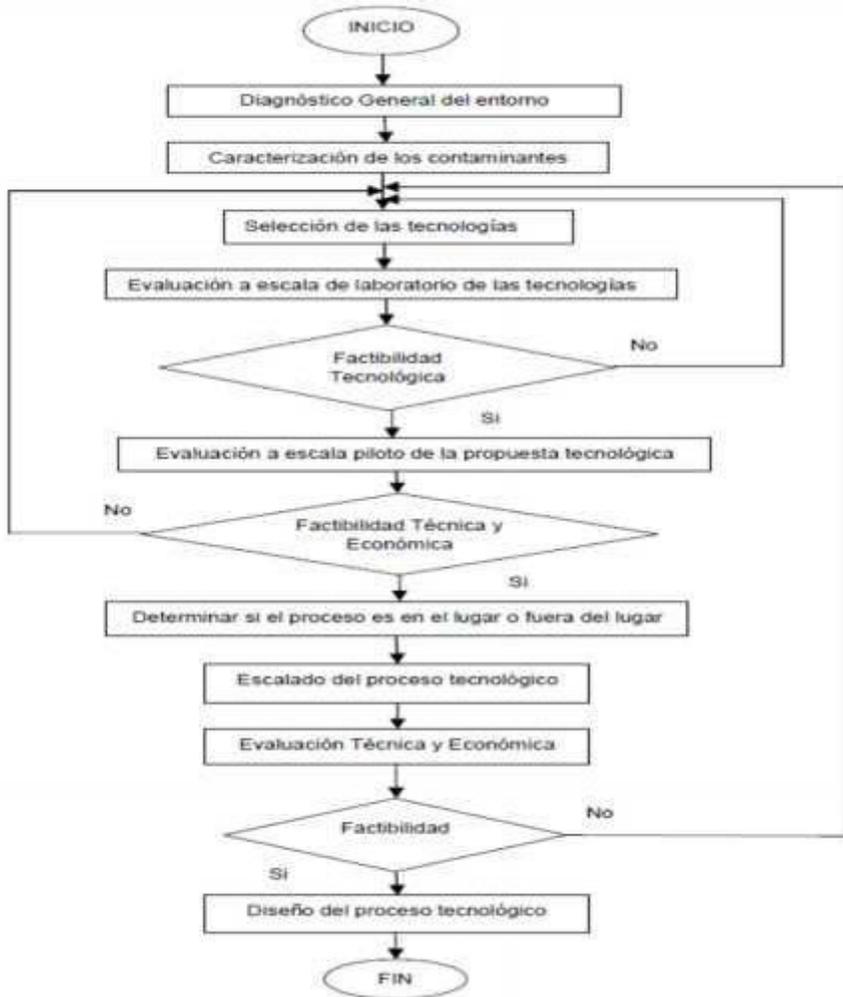
Anexo 1: Estructura química de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo. Fuente: (Ponce, 2014).



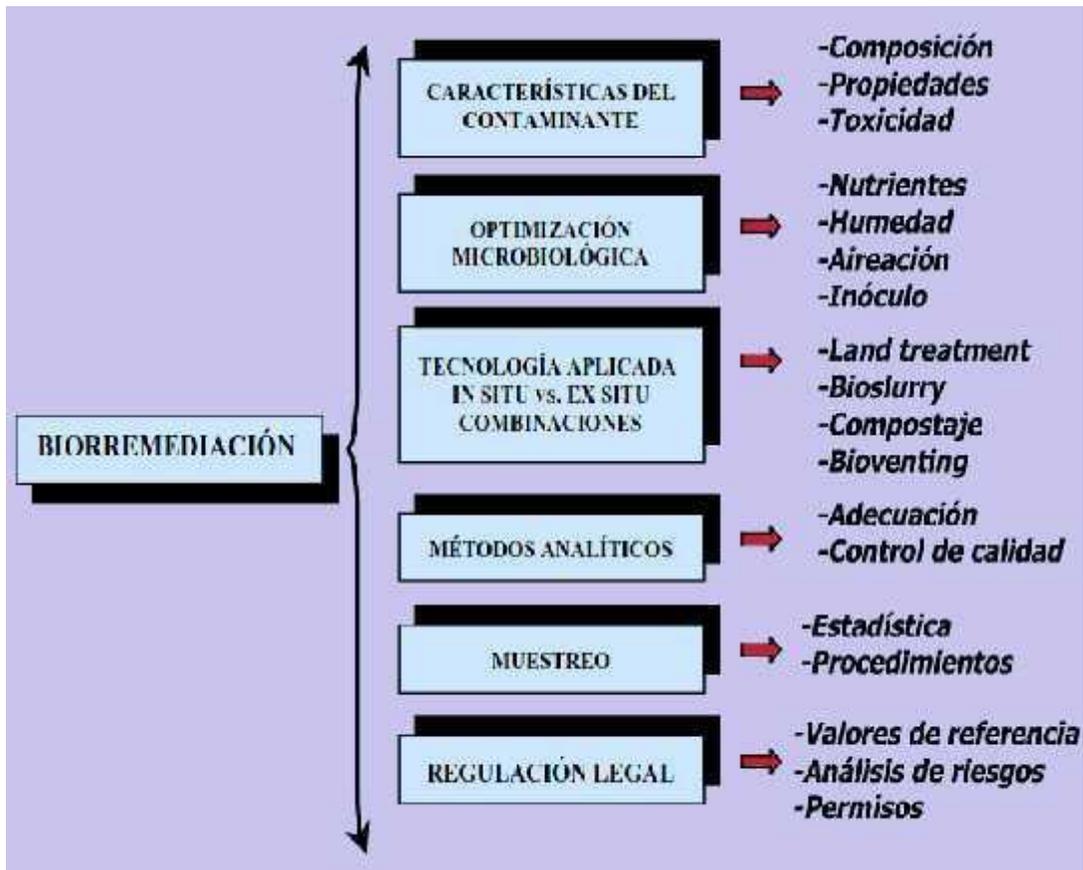
Anexo 2: Entidades con evidencia de contaminación con hidrocarburos en la región central de Cuba. Fuente: (Jiménez, 2018).



Anexo 3: Diagrama heurístico para selección y diseño de tecnologías de recuperación de suelos contaminados. Fuente: (Fabelo, 2017).



Anexo 4: Consideraciones a tener en cuenta para la biorremediación. Fuente: (Sánchez & Rodríguez, 2005).



Anexo 5: Factores específicos que condicionan la biodegradación de hidrocarburos .

Fuente: (Ccolque & Vargas, 2017)

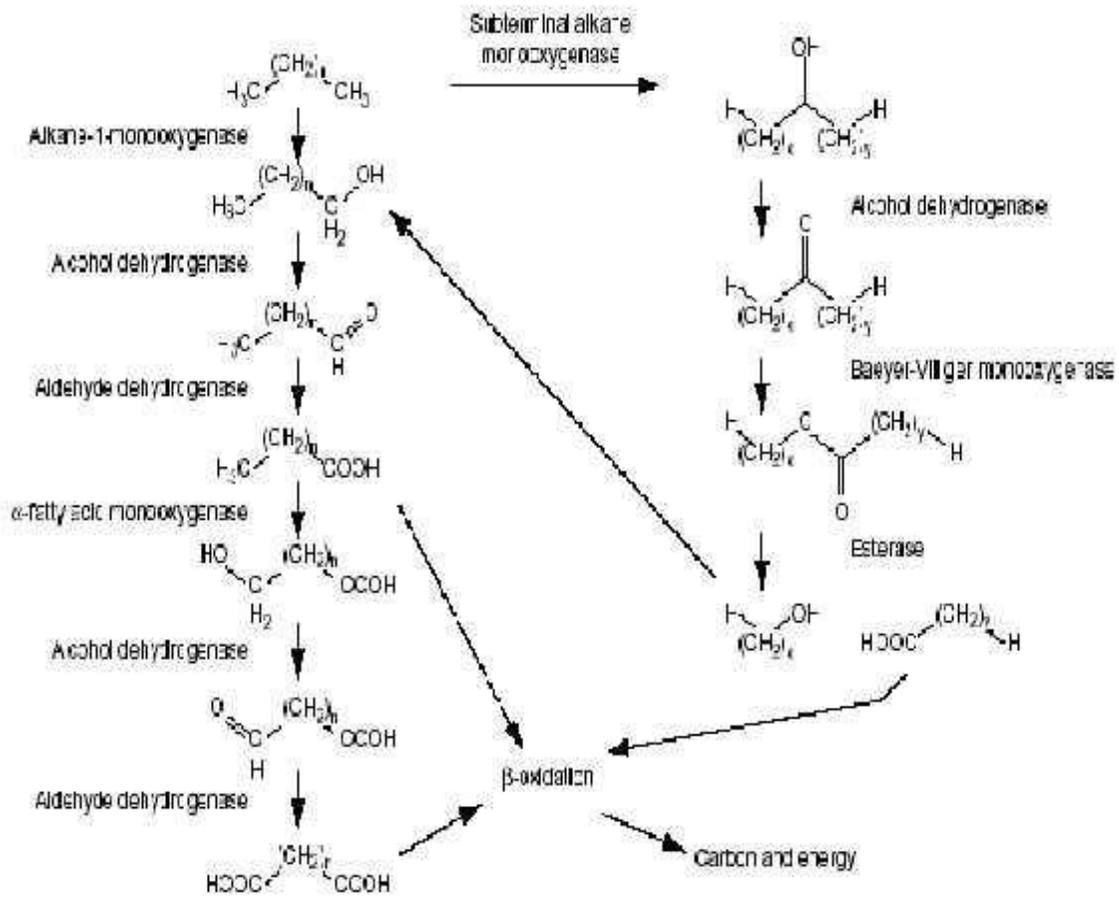
Microbiológicos	Crecimiento crítico de la biomasa Mutación y transferencia horizontal de genes Enriquecimiento de las poblaciones microbianas Producción de metabolitos tóxicos Interacciones microbianas (competencia, depredación, etc.)
Medioambientales	Agotamiento de los sustratos preferenciales Falta de nutrientes Condiciones ambientales inhibitorias (pH, T ^o , concentración de O ₂ , etc.) Presencia de una fuente de carbono alternativa
Del contaminante	Concentración de contaminante/sustrato Estructura química del contaminante - Biodegradabilidad Toxicidad del contaminante Solubilidad del contaminante Co-metabolismo
Interacción del proceso biológico aerobio/anaerobio	Potencial de oxidación/reducción Disponibilidad de aceptores de electrones Población microbiana presente
Limitaciones en la transferencia de materia en la matriz	Biodisponibilidad (equilibrio de adsorción/desorción) Incorporación en materia húmica Difusión y solubilidad del oxígeno en la matriz Difusión de los nutrientes en la matriz

Anexo 6: Tipos de reacciones en los procesos de degradación aeróbicos y anaeróbicos .

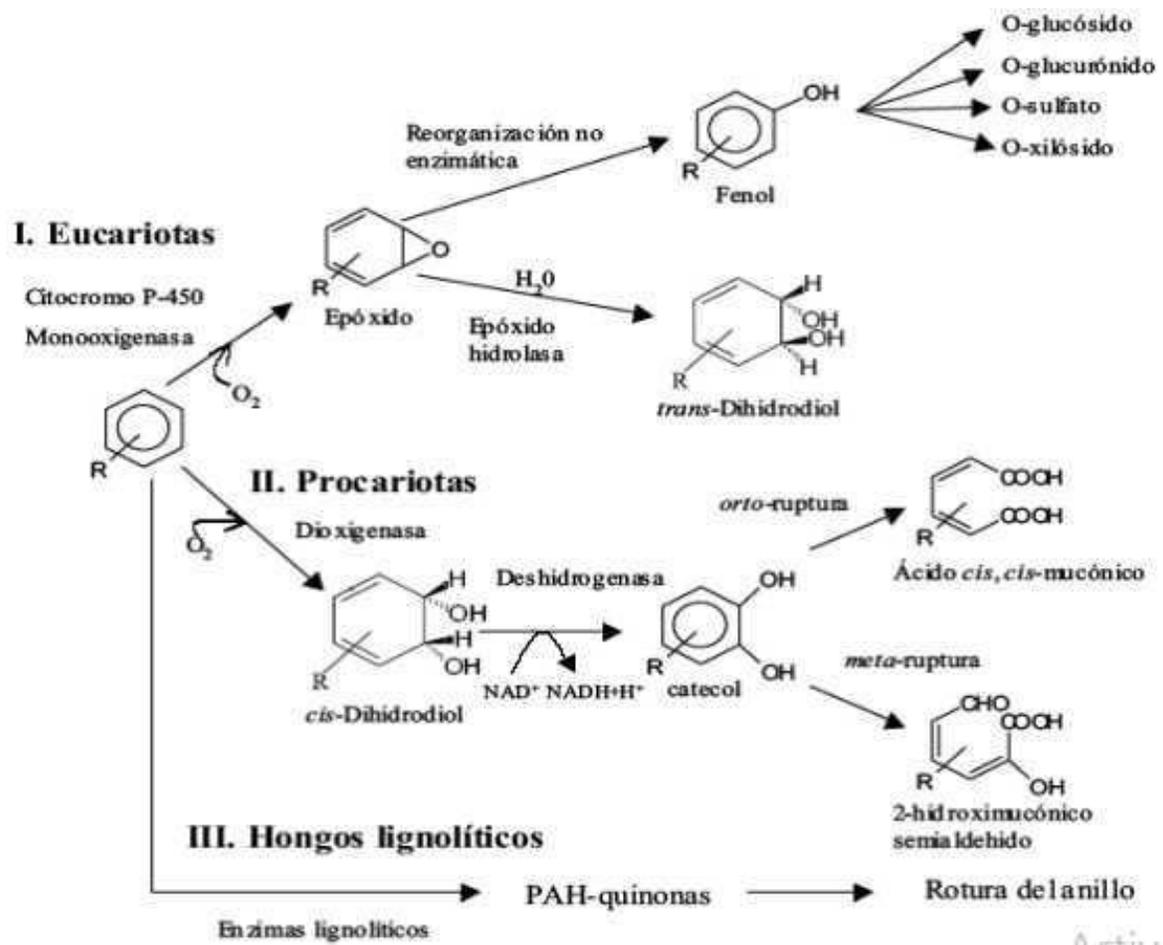
Fuente: (Ponce, 2014).

Degradación aerobia:	$\text{Sustrato} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
Degradación anaerobia:	$\text{Sustrato} + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{N}_2$ $\text{Sustrato} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{S}^{2+}$ $\text{Sustrato} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{Fe}^{2+}$ $\text{Sustrato} + \text{Mn}^{4+} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{Mn}^{2+}$ $\text{Sustrato} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{CH}_4$

Anexo 7: Rutas de degradación de los alcanos por oxidación del grupo metil terminal, subterminal y biterminal. Fuente: (Braibant, 2004).



Anexo 8: Ruta de degradación de los hidrocarburos aromáticos. Fuente: (Nilanjana & Preethy, 2011).



Anexo 9: Tipos de bacterias más comunes usadas en los procesos de biorremediación.

Fuente: (Toledo, 2011).

Grupo de bacterias	Genero		Importancia ambiental
Bacterias de descomposición	Pseudomonas		Degrada compuestos orgánicos
	Flavobacterium		Degrada proteina
	Zooglea		Organismo formador de floculos en plantas de lodos activados
	Clostridium		Producen ácidos grasos a partir de materia orgánica en un digestor anaerobio
	Micrococcus		
	Methanobacterium		Producen metano gaseoso a partir de ácidos grasos en un digestor anaerobio
	Methanococcus		
Methanosarcina			
Bacterias nitrificantes	Nitrobacter		Oxidan compuestos nitrogenados inorgánicos
	Nitrosomonas		
Bacterias desnitrificantes	Bacillus Pseudomonas		Reducen nitratos y nitritos a nitrógeno gaseoso u oxido nítrico
Bacterias degradadoras de cloro	Pseudomonas transgenicas		Degradan compuestos tóxicos que contienen cloro (como el vinilcloruro) en compuestos menos nocivos
Bacterias fijadoras de nitrógeno	Azobacter Beijerinckia		Capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en NH3

Grupo de bacterias		Genero	Importancia ambiental
Bacterias reductoras de sulfatos		Desulfovibrio	 Interviene en la corrosión de tuberías de hierro
Bacterias fotosintéticas		Chlorobium	 Reducen sulfuros a azufre elemental
		Chromatium	
Bacterias férricas	Filamentosas	Sphaerotilus	 Dan volumen a los lodos en las plantas de lodos activados
	Oxidantes del hierro	Leptothrix	 Oxidan el hierro ferroso
Bacterias degradadoras de hidrocarburos		Pseudomonas Arthrobacter Actinomyces Aerobacter Flaviobacterium Corynebacterium Sphingomonas Micrococcus	  Degradan hidrocarburos

Anexo 10: Ventajas y desventajas de la biorremediación in situ y ex situ. Fuente: (Ponce, 2014)

Biorremediación	<i>In situ</i>	<i>Ex situ</i>
Ventajas	<p>Permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar.</p> <p>Potencial disminución en costos.</p>	<p>Menor tiempo de tratamiento.</p> <p>Más seguros en cuanto a uniformidad: es posible homogeneizar y muestrear periódicamente.</p>
Desventajas	<p>Mayores tiempos de tratamiento.</p> <p>Pueden ser inseguros en cuanto a uniformidad: heterogeneidad en las características del suelo.</p> <p>Dificultad para verificar la eficacia del proceso.</p>	<p>Necesidad de excavar el suelo.</p> <p>Aumento en costos e ingeniería para equipos.</p> <p>Debe considerarse la manipulación del material y la posible exposición al contaminante.</p>

Anexo 11: Representación esquemática de sistemas de biopilas alargadas (a) y estáticas (b). Fuente: (Velasco & Volke, 2003).

El sistema de biopilas alargadas (figura a) es el proceso de composteo más económico y sencillo. En éste, el material a compostear se apila sobre una plataforma en montones alargados. La aireación se realiza mediante el mezclado manual o mecánico de la composta, proceso que a su vez permite homogeneizar la temperatura. El mezclado de la composta proporciona una mayor distribución y facilita la biodegradación de los contaminantes, ya que facilita la homogeneización de los nutrientes, agua, aire, contaminantes y microorganismos. La frecuencia del mezclado de la pila depende de la actividad microbiana, que generalmente puede determinarse por el perfil de la temperatura en la composta, que puede realizarse una vez al día o bien una vez al mes.

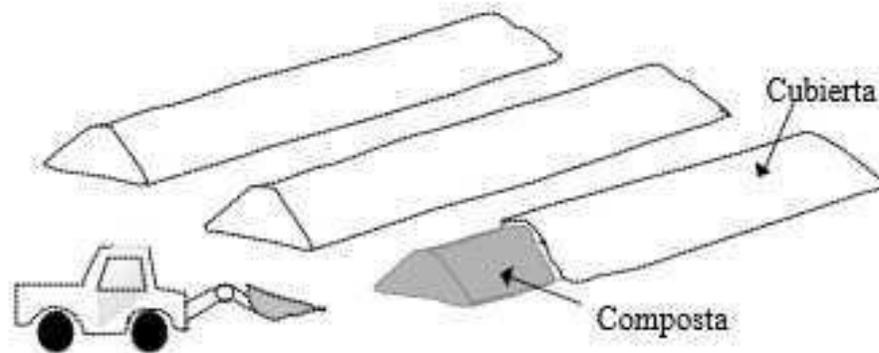
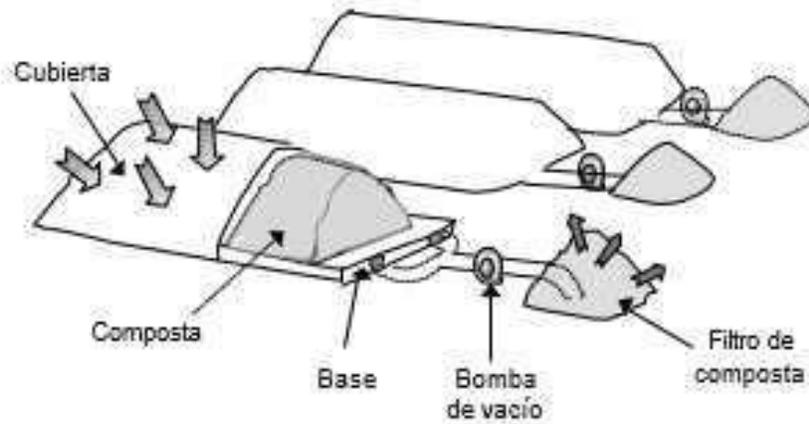


Figura a: Biopilas alargadas.

A diferencia del caso anterior, las biopilas estáticas (figura b) no necesitan mezclarse mecánicamente, ya que la aireación y homogeneización del calor en la composta se lleva a cabo por medio de un sistema de inyección (compresor) o extracción (vacío) de aire, mediante tubos colocados en la base alineados paralelamente a lo largo de la pila. En las biopilas estáticas, normalmente se emplea un sistema de extracción de aire, lo que permite la captura de los vapores de cierta fracción de compuestos orgánicos volátiles que llegan a ser removidos del suelo contaminado durante el proceso de aireación. Estos vapores son enviados a un sistema de biofiltración u oxidación catalítica para su tratamiento. El uso de un sistema de inyección o extracción de aire en este tipo de biopila, permite el control manual

o automático de la velocidad del flujo de aire que provee de oxígeno al proceso de composteo, permitiendo así establecer una relación entre el flujo de aire y la actividad microbiana a través del tiempo

Figura b: Biopilas estáticas.



Anexo 12: Lista de chequeo para evaluar la pertinencia de la ecotecnología de biopilas.

Fuente: (EPA, 2017).

1. Soil Characteristics That Contribute To Biopile Effectiveness

Yes No

- Is the total heterotrophic bacteria count > 1,000 CFU/gram dry soil?
- Is the soil pH between 6 and 8?
- Is the soil moisture between 40% and 85%?
- Is the soil temperature between 10°C and 45°C?
- Is the carbon:nitrogen:phosphorous ratio between 100:10:1 and 100:1:0.5?
- Does the soil divide easily and tend not to clump together?

2. Constituent Characteristics That Contribute To Biopile Effectiveness

Yes No

- Are products to be treated primarily kerosene or heavier (i.e., not gasoline), or will air emissions be monitored and, if necessary, controlled?
- Are most of the constituents readily degradable?
- Are total petroleum constituents \leq 50,000 ppm and total heavy metals \leq 2,500 ppm?

3. Climatic Conditions That Contribute To Biopile Effectiveness

Yes No

- Is the rainfall less than 30 inches during the biopile season?
- Are high winds unlikely?

4. Biotreatability Evaluation

Yes No

- Has a biotreatability study been conducted?
- Was biodegradation demonstrated, nutrient application and formulation defined, and potential inhibitors or toxic conditions checked?

5. Evaluation Of Biopile Design

Yes No

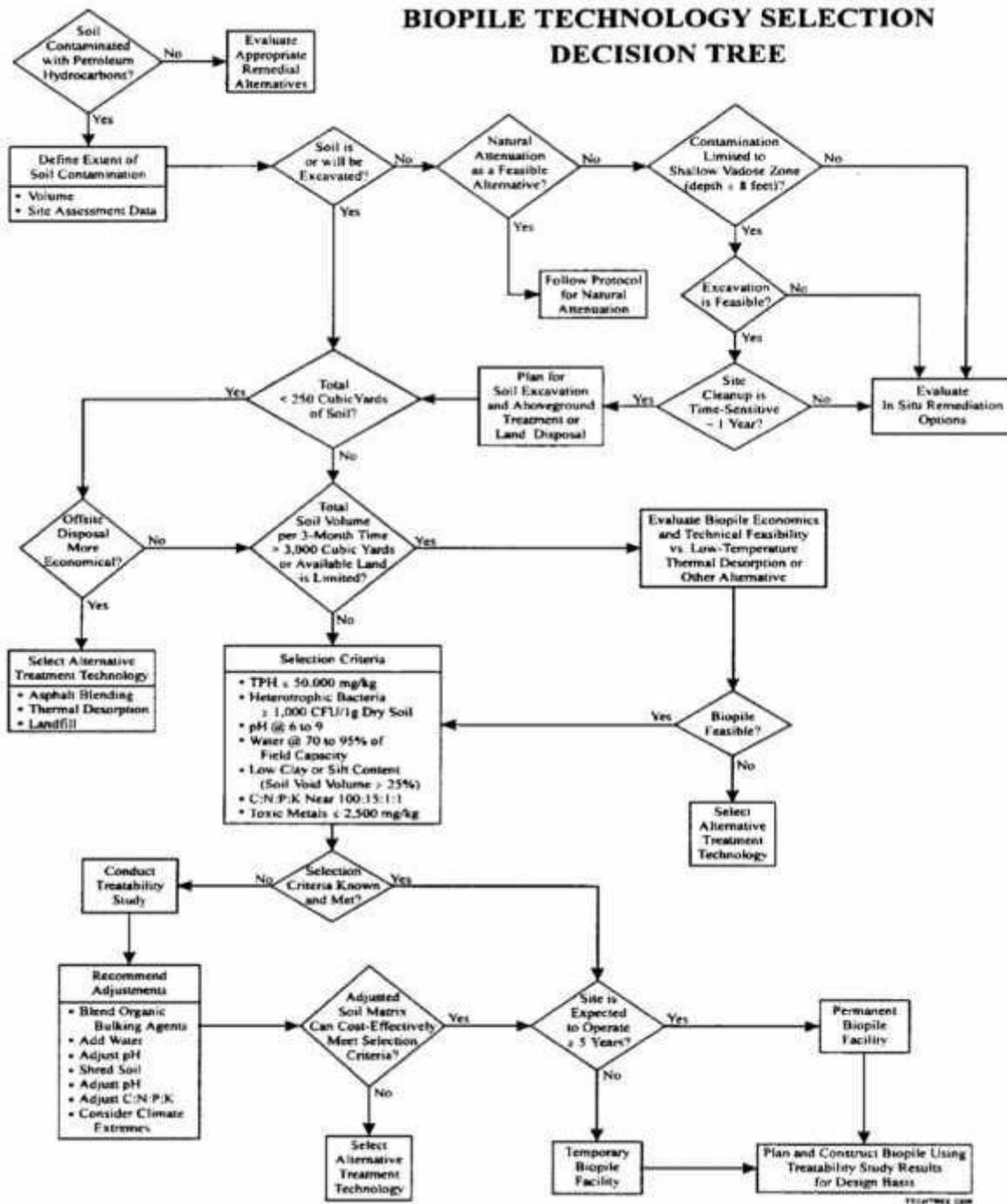
- Is sufficient land available considering the biopile depth and additional space for berms and access?
- Is runoff and runoff controlled?
- Are erosion control measures specified?
- Are the frequency of application and composition of nutrients and pH adjustment materials specified?
- Is moisture addition needed?
- Are other sub-optimal natural site conditions addressed in the biopile design (e.g., low temperatures, poor soil texture, and excessive rainfall)?
- Is the site secured?
- Are air emissions estimated and will air emissions monitoring be conducted?
- Are provisions included for air emissions controls, if needed?

6. Operation And Monitoring Plans

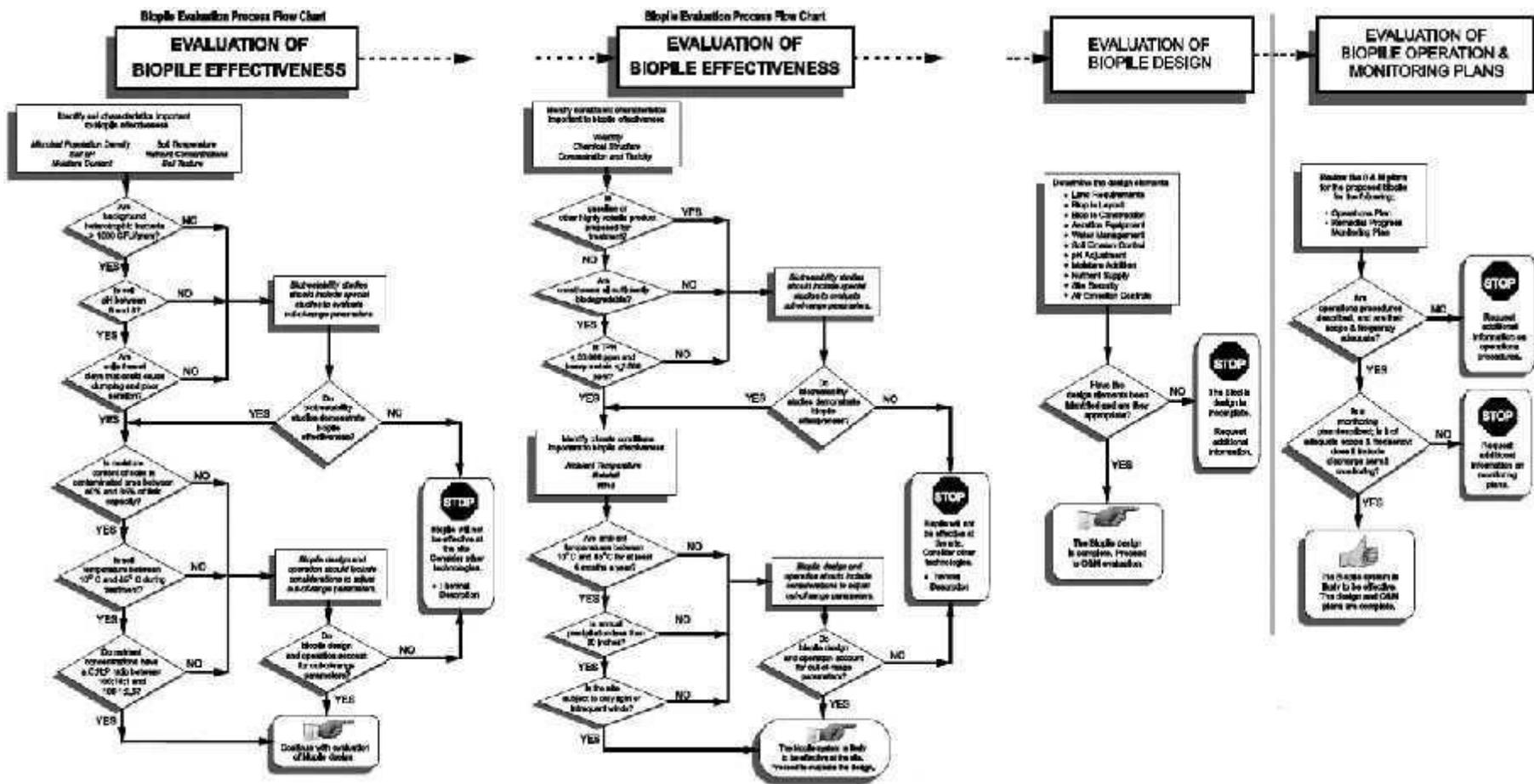
Yes No

- Are frequencies of aeration, nutrient addition, and moisture addition provided in the operation plan?
- Is monitoring for constituent reduction and biodegradation conditions proposed?
- Are air, soil, and surface runoff water sampling (if applicable) proposed to ensure compliance with appropriate permits?
- Are the proposed number of samples to be collected, sampling locations, and collection methods in accordance with state regulations?
- Is quarterly (or more frequent) monitoring for soil pH, moisture content, bacterial population, nutrient content, and constituent concentrations proposed?

Anexo 13: Árbol de decisión para la selección de la ecotecnología de biopila. Fuente: (BATTELLE & NFESC, 1996).



Anexo 14: Diagrama de flujo del proceso de evaluación de la tecnología de biopilas. Fuente: (EPA, 2017).



Anexo 15: Ventajas y desventajas de la ecotecnología de biopilas. Fuente: (EPA, 2017).

Advantages And Disadvantages Of Biopiles	
Advantages	Disadvantages
<ul style="list-style-type: none"> ○ Relatively simple to design and implement. ○ Short treatment times: usually 6 months to 2 years under optimal conditions. ○ Cost competitive: \$30-90/ton of contaminated soil. ○ Effective on organic constituents with slow biodegradation rates. ○ Requires less land area than landfarms. ○ Can be designed to be a closed system; vapor emissions can be controlled. ○ Can be engineered to be potentially effective for any combination of site conditions and petroleum products. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Concentration reductions > 95% and constituent concentrations < 0.1 ppm are very difficult to achieve. ○ May not be effective for high constituent concentrations (> 50,000 ppm total petroleum hydrocarbons). ○ Presence of significant heavy metal concentrations (> 2,500 ppm) may inhibit microbial growth. ○ Volatile constituents tend to evaporate rather than biodegrade during treatment. ○ Requires a large land area for treatment, although less than landfarming. ○ Vapor generation during aeration may require treatment prior to discharge. ○ May require bottom liner if leaching from the biopile is a concern.

Anexo 16: Etapas del diseño de experimento y salidas relevantes. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Etapa	Preguntas en la etapa	Salidas y opciones relevantes
1. Planeación y diseño	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuántos factores? • ¿Cuántas respuestas? • ¿Cuántos niveles?, ¿cuáles niveles? • ¿Cuántas réplicas o repeticiones? • ¿Hay restricciones de algún tipo?, ¿en cuántos bloques? • ¿Cuánto cuesta cada corrida? • ¿Cuáles efectos se podrán estudiar? • ¿Cuál es el experimento más apropiado? • ¿Cómo se capturan los datos? 	<p>Sólo algunos aspectos de esta etapa se trabajan en el software, pero hay más opciones si el diseño es un factorial fraccionado: determinación del tamaño de muestra o número de réplicas, matriz de diseño aleatorizada, generadores, resolución, estructura de alias, repeticiones, puntos al centro, bloques y hoja de trabajo para capturar los datos del experimento.</p>
2. Análisis	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles efectos son significativos? • ¿Cuáles factores contribuyen a explicar la respuesta? • ¿Cuánto explica cada modelo? • ¿Cuál es el modelo más apropiado? 	<p>Análisis de varianza (ANOVA), significancia de los efectos, gráfico de efectos en papel normal, Pareto de efectos, agregar y excluir efectos, porcentaje de explicación de cada modelo y selección del mejor modelo.</p>
3. Interpretación	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es el mejor tratamiento? • ¿Cómo afecta el factor X? • ¿Cuál es el valor esperado de la respuesta en el mejor tratamiento? • ¿Cómo es la superficie de respuesta? • ¿Qué porcentaje de la variación observada explica el modelo? • ¿Cuál es el tratamiento óptimo? 	<p>Gráficas de medias, gráficas de efectos, tabla de predichos o estimados, gráfico de cubo, intervalos de confianza para la respuesta media y para la observación futura, gráficas de superficie y de contornos, porcentaje de explicación de la respuesta, optimización, determinación del mejor tratamiento o punto óptimo.</p>
4. Diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Se cumple los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia? • ¿Hay observaciones atípicas? • ¿Se ajusta bien el modelo? 	<p>Gráficas de residuos: en papel de probabilidad normal, contra los predichos, contra los factores y ordenados en el tiempo. Prueba de homogeneidad de varianzas, observaciones influyentes y gráfico de observados contra predichos.</p>

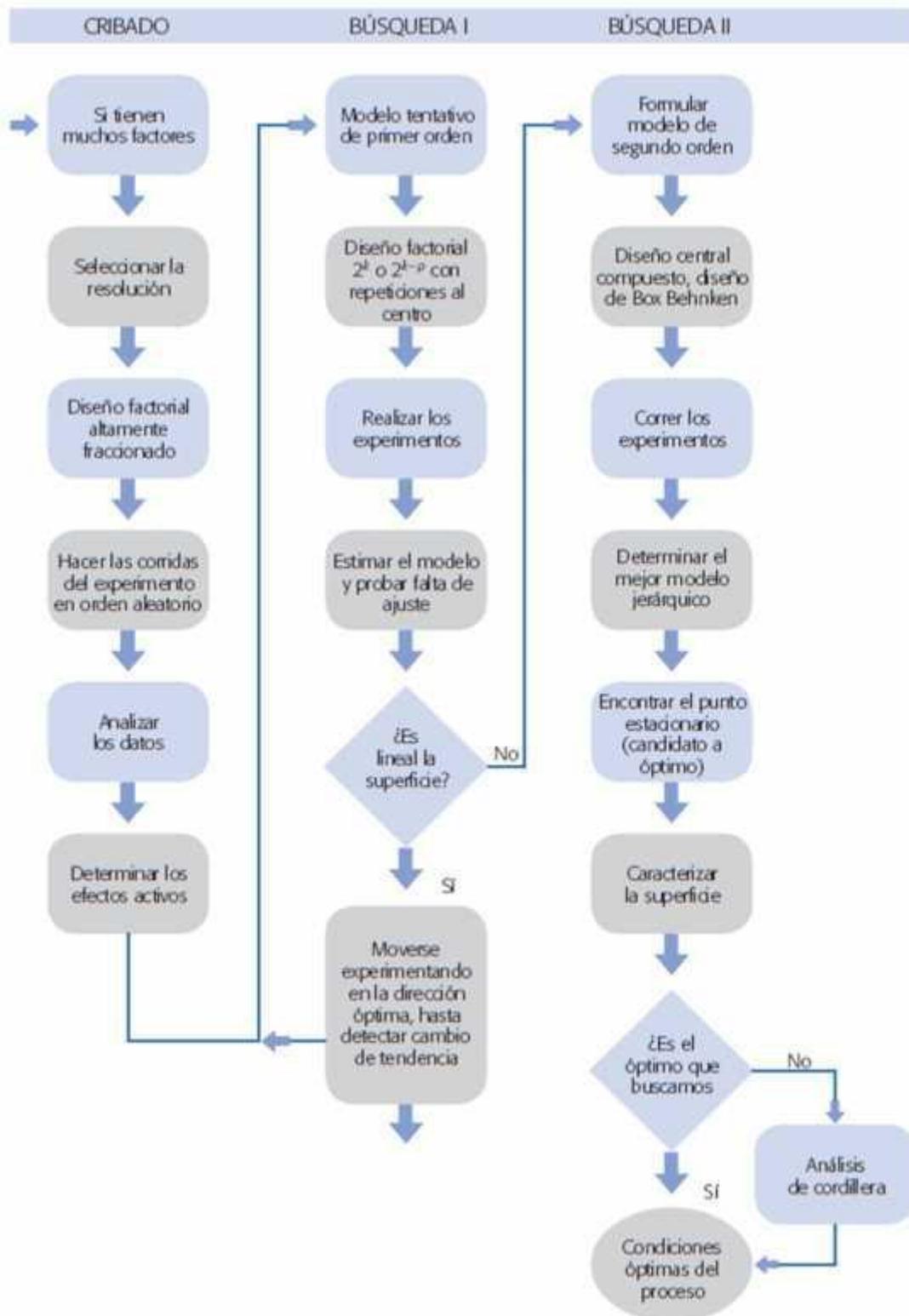
Anexo 17: Clasificación de los diseños de experimentos de acuerdo con sus objetivos.

Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

1. Diseños para comparar dos o más tratamientos	{ Diseño completamente al azar Diseño de bloques completos al azar Diseño de cuadros latino y grecolatino	
2. Diseños para estudiar el efecto de varios factores sobre una o más variables de respuesta	{ Diseños factoriales 2^k Diseños factoriales 3^k Diseños factoriales fraccionados 2^{k-p}	
3. Diseños para la optimización de procesos	{ Diseños para el modelo de primer orden	{ Diseños factoriales 2^k y 2^{k-p} Diseño de Plackett-Burman Diseño simplex
	{ Diseños para el modelo de segundo orden	{ Diseño de composición central Diseño de Box-Behnken Diseños factoriales 3^k y 3^{k-p}
4. Diseños robustos	{ Arreglos ortogonales (diseños factoriales) Diseño con arreglos interno y externo	
5. Diseños de mezclas	{ Diseño simplex-reticular Diseño simplex con centroide Diseño con restricciones Diseño axial	

Anexo 18: Esquema de los elementos de la Metodología de Superficie y Respuesta.

Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).



Anexo 19: Modelos empleados en la Metodología de Superficie y Respuesta. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012)

Si se tienen k factores, los modelos de primer y segundo orden están dados por las ecuaciones 1 y 2 respectivamente:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (1)$$

Ecuación 1: Modelo de primer orden utilizado en la MSR. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2)$$

Ecuación 2: Modelo de segundo orden utilizado en la MSR. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Para ambos modelos:

Y: variable de respuesta.

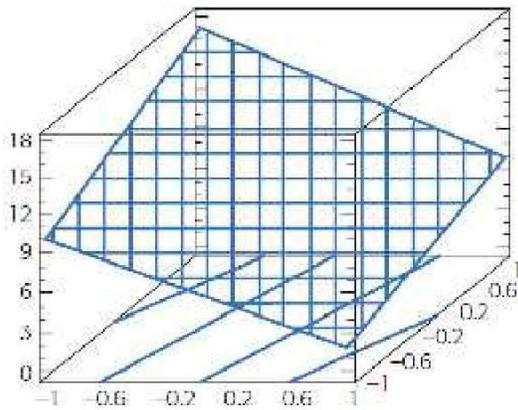
X_i: i factores estudiados.

β₀, β_i, β_{ij}: coeficientes del modelo.

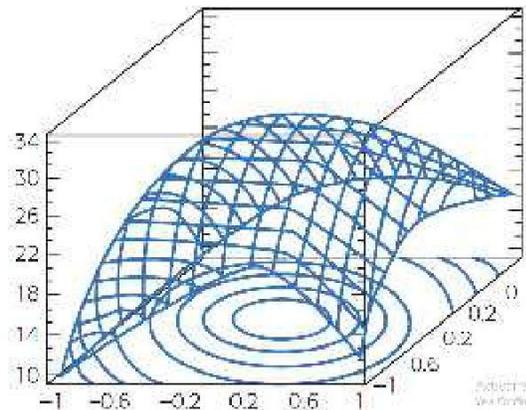
ε: error.

Anexo 20: Forma que toma la superficie en dependencia de los coeficientes del modelo:

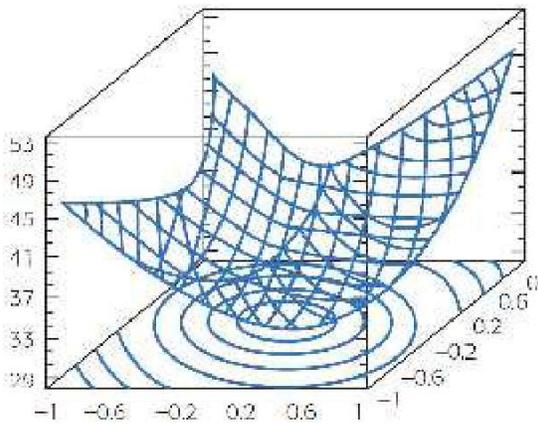
(a) para modelos de primer orden, (b) superficie de máximo (montaña) para modelos de segundo orden, (c) superficie de mínimo (valle) para modelos de segundo orden, (d) superficie con punto de silla (minimax) para modelos de segundo orden. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).



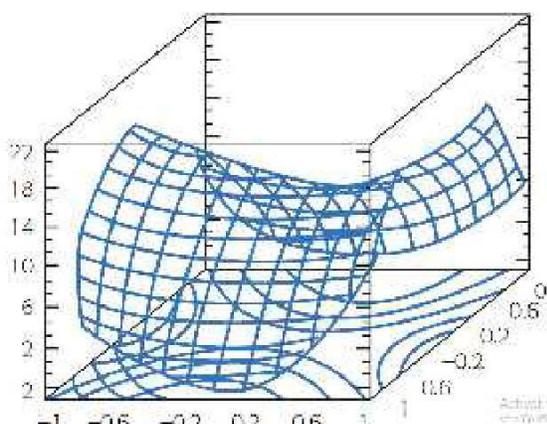
(a)



(b)



(b)

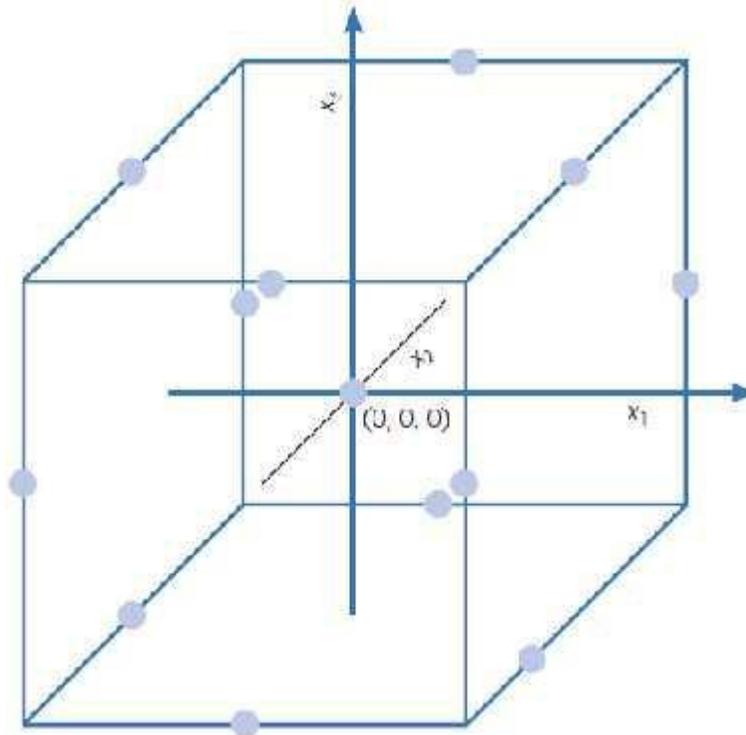


(d)

Anexo 21: Quince tratamientos del diseño Box -Behnken para tres factores y tres puntos centrales. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Tratamiento	x_1	x_2	x_3	Tratamiento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0	9	-1	0	-1
2	1	-1	0	10	1	0	-1
3	-1	1	0	11	-1	0	1
4	1	1	0	12	1	0	1
5	0	-1	-1	13	0	0	0
6	0	1	-1	14	0	0	0
7	0	-1	1	15	0	0	0
8	0	1	1				

Anexo 22: Representación geométrica de los puntos del diseño de Box -Behnken. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).



Anexo 23: Ciclo de Deming y los experimentos. Fuente: (Gutiérrez & De la Vara, 2012).



Anexo 25: Propiedades físicas de la muestra de suelo. Fuente: (ENIA, 2018)

Muestra	Granulometría (% que pasa tamices)				Hidrómetro (% de partículas)					Límites de Plasticidad			Pe _{so} específico (adim)	Permeabilidad		Clasificación SUCS	Clasificación AASHTO	
	N ₄	N ₁₀	N ₄₀	N ₂₀₀	Grava	Arena	Limo	Arcilla	Coloides	L	LP	I		P	cm/s			Kf
	99,90	97,90	76,00	39,70	0,10	60,20	18,20	21,50	13,10	25,60	19,50	6,14	2,64	1x10 ⁻¹ 1x10 ⁻³ hasta	SC-SM	A-4(1)		

Simbología empleada

T-4	por ciento pasado por el tamiz # 4	LL(%)	Límite Líquido de Casagrande
T-10	por ciento pasado por el tamiz # 10	LP(%)	Límite Plástico de Casagrande
T-40	por ciento pasado por el tamiz # 40	IP(%)	Índice de Plasticidad
T-200	por ciento pasado por el tamiz # 200	Kf	Coefficiente de Filtración

Anexo 26: Libro de cálculo de Microsoft Office Excel para la determinación de las dimensiones de las unidades experimentales. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

BALANCE DE MASA A NIVEL DE UNIDAD EXPERIMENTAL						
Tratamiento No. 1			-1	0	+1	
Conc. HTP	1	39000,00	22000,00	30500,00	39000,00	
% Texturizante	0	8,00	4,00	8,00	12,00	
% Humedad	-1	20,00	20,00	25,00	30,00	
Peso de muestras por muestreo						
	CEINPET		g	500		
	CEBIMAR		g	250		
	UCTB		g	200		
	Total		Kg	0,950		
Peso de muestras total						
	No. de muestreos		u	3		
	Total		Kg	2,850		
Peso total inicial de la Biopila						
	% peso muestra total		%	7,5		
	Peso total inicial de la Biopila		Kg	38		
	Peso de muestra para ecotoxicología		Kg	4		
	Peso total de la Biopila		Kg	42		
Peso de Residuo Petrolizado en la Biopila						
	Concentración HTP Residuo Petrolizado		mg/kg	123725,00		
	Peso de Residuo en la Biopilas		kg	13,35		
Peso de Texturizante la Biopila						
	% peso de Texturizantes Total Biopilas		%	8,00		
	% peso de Texturizante 1		%	75,00		
	% peso de Texturizante 2		%	25,00		
	Peso de texturizantes en la Biopilas		kg	3,36		
	Peso de texturizantes 1 en la Biopilas		kg	2,52		
	Peso de texturizantes 2 en la Biopilas		kg	0,84		
Peso de Suelo en la Biopila						
	Peso de Suelo en la Biopilas		kg	25,29		
Peso de Agua en la Biopila húmeda						
	Humedad inicial en la Biopila seca		%	9,00		
	Humedad final requerida en la Biopila húmeda		%	20,00		
	Peso final en la Biopila húmeda		kg	43,23		
	Peso de agua a añadir		kg	5,23		
	Volumen de agua a añadir		MI	5225,00		
Estimación de la densidad aparente y volumen de la Biopila						
	Densidad aparente del Suelo		kg/m ³	1058,00		
	Densidad aparente del Residuo Petrolizado		kg/m ³	823,00		
	Densidad aparente del Texturizante 1		kg/m ³	278,00		
	Densidad aparente del Texturizante 2		kg/m ³	73,00		
	Densidad aparente del Agua		kg/m ³	1000,00		
	Volumen de Suelo		cm³	23903,77		
	Volumen de Residuo Petrolizado		cm³	16220,92		
	Volumen de Texturizante 1		cm³	9064,75		
	Volumen de Texturizante 2		cm³	11506,85		
	Volumen total Componentes Secos		cm³	60696,28		
	Densidad aparente Componentes Secos		kg/m³	691,97		
	Densidad aparente de la Biopila Húmeda		kg/m ³	737,40		
	Volumen total de la Biopila SECA INICIAL		cm³	60696,28		
	Volumen de muestra para Ecotoxicología		cm³	5780,60		
	Volumen de total de la Biopila SECA FINAL		cm³	54915,68		
DISEÑO INGENIERO						
Dimensiones de la Biopila						
	Forma de la Biopila		Pirámide truncada		L y B	I y b
	Altura requerida de la Biopila		cm	20,00		
	Ángulo reposo de la Biopila			45°		
B - b	L - l	L	B	l	b	L = l+2h B = b+2h
40,00	40,00	88,00	59,00	48,00	19,00	88,00 59,00
		Altura calculada de la Biopila	cm	19,90		
		Error	%	0,5181		
		Relación L:B		1,492		

Anexo 27: Libro de cálculo de Microsoft Office Excel para la adición de enmiendas a las unidades experimentales. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2	CALCULOS DE LAS ENMIENDAS							
3	Concentración de Residuo Petrolizado en la Biopila	45000,00	mg/kg	Masa de Carbono asumido en el Residual Petrolizado	1512,00	g		
4				Masa Total de Carbono aportada por el Residual y Texturizantes	2610,97	g		ANADIR
5				Nitrógeno necesario	261,10	g	211,45	g
6				Fosforo necesario	26,11	g	0,00	g
7				Potasio necesario	2,61	g	2,61	g
8	Masa de Biopila	42	kg					
9	Masa de Bagazo	840,00	g	Masa de Carbono aportada por Bagazo	493,67	g		
10	Masa de Estiércol	2520,00	g	Masa de Carbono aportada por el Estiércol	605,30	g		
11	Concentración de Fosforo en Bagazo	0,03	%	Masa de Fosforo aportado por el Bagazo	0,25	g		
12	Concentración de Nitrógeno en Bagazo	0,18	%	Masa de Nitrógeno aportado por el Bagazo	1,51	g		
13								
14	Concentración de Fosforo en Estiércol	1,18	%	Masa de Fosforo aportado por el Estiércol	29,74	g		
15	Concentración de Nitrógeno en Estiércol	1,91	%	Masa de Nitrógeno aportado por el Estiércol	48,13	g		
16								
17				Masa de Fosforo Total aportado por Texturizantes	29,99	g		
18				Masa de Nitrógeno Total aportado por Texturizantes	49,64	g		
19								
20	Masa de NH_4NO_3 necesaria con 35% N			Relación mísica de N	0,35		604,15	g
21	Masa de Superfosfato Simple $Ca(H_2PO_4)_2$ con 28% P_2O_5			Relación mísica de P	0,09		0,00	g
22	Masa de Cloruro de Potasio KCl con 60% K_2O			Relación mísica de K	0,50		5,24	g

Anexo 28: Masa de enmiendas añadidas a cada unidad experimental. Fuente: Elaboración propia.

Tratamiento	Masa de Nitrato de Amonio (g)	Masa de Superfosfato simple (g)	Masa Sulfato de potasio (g)
1	604,15	0,00	6,05
2	508,15	0,00	5,27
3	594,23	0,00	6,54
4	508,15	0,00	5,27
5	412,15	0,00	4,49
6	422,08	25,69	4,00
7	690,23	0,00	7,32
8	594,23	0,00	6,54
9	412,15	0,00	4,49
10	518,08	63,87	4,78
11	422,08	25,69	4,00
12	498,23	0,00	5,77
13	508,15	0,00	5,27
14	326,08	0,00	3,22
15	604,15	0,00	6,05

Anexo 29: Libro de cálculo de Microsoft Office Excel con los datos semanales de la temperatura y humedad de las unidades experimentales. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Fecha	Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	Temperatura							
									8	9	10	11	12	13	14	15
19/03/2019	1	24	24	24	23,5	23	23	23,5	23,5	23,5	23,5	23	23,5	23	23,5	23,5
26/03/2019	2	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
02/04/2019	3	24	25	23	23	22,5	23	23	23	23	22,5	23	23	23	23	23
09/04/2019	4	24,5	24,5	24	24	24	24	24	24	24,5	23	23	24,5	24,5	24	23
16/04/2019	5	24	23	23	23	23	23	22	23	22,5	23	22,5	23	23	23	22,5
23/04/2019	6	24	23	23	23	23	23	22	23	22,5	23	22,5	23	23	23	22,5
30/04/2019	7	23,5	23	23	23	22,5	23	23	23	23	23	22,5	23	23	23	22,5
07/05/2019	8	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
14/05/2019	9	24	24	24	23,5	23	23	23,5	23,5	23,5	23,5	23,5	23,5	23,5	23,5	23,5
21/05/2019	10	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
28/05/2019	11	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
04/06/2019	12	24	23	23	23	22,5	23	23	23	23	22,5	23	23	23	23	23
11/06/2019	13	24,5	24,5	24,5	24	24	24	24	24	24	24,5	24	24,5	24,5	24,5	24
18/06/2019	14	24	23	23	23	23	23	23	23	22,5	23	22,5	23	23	23	22,5
25/06/2019	15	23,5	23	23	23	22,5	23	23	23	23	23	22,5	23	23	23	22,5
02/07/2019	16	26	25,5	26	26	25	25	25	25	26	26	26	25,5	26	26	26
09/07/2019	17	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
16/07/2019	18	27	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
23/07/2019	19	25	25	25	25	25	25	25,5	25	25	25	25	25	25,5	25	24
30/07/2019	20	27	25,5	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
06/08/2019	21	26	26	26	25,5	25	25	25	25	26	26	26	26	26	26	26
13/08/2019	22	26	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
20/08/2019	23	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
27/08/2019	24	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
03/09/2019	25	26	26	26	26	26	26	25	26	26	26	26	26	26	26	26
10/09/2019	26	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
17/09/2019	27	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
24/09/2019	28	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
01/10/2019	29	25	25	24	25	24,8	24,4	24,1	24,2	24	24	24	24	24	24	24
08/10/2019	30	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
15/10/2019	31	26	25	25	25	25	25	25	26	26	26	26	26	26	26	26

3.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Fecha	Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
19/03/2019	1	19,50	23,00	26,72	23,51	20,12	18,65	23,82	19,69	18,00	23,39	27,61	23,04	24,82	23,00	-
26/03/2019	2	18,41	23,48	26,22	23,19	18,00	18,00	24,29	18,00	18,00	23,00	27,44	23,00	23,00	23,00	28,00
02/04/2019	3	18,50	23,41	26,30	23,00	18,61	18,00	23,00	18,54	28,22	23,40	28,00	24,00	23,30	23,40	-
09/04/2019	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16/04/2019	5	-	23,00	29,15	25,25	18,48	18,29	28,05	18,49	19,17	23,37	26,94	23,03	24,29	23,19	30,54
23/04/2019	6	18,14	23,36	26,67	23,95	18,99	19,14	27,00	19,46	18,50	23,45	-	24,18	24,05	23,45	28,67
30/04/2019	7	18,33	23,67	26,33	23,67	18,44	18,44	24,11	18,44	28,22	23,55	26,90	23,11	23,00	23,67	28,30
07/05/2019	8	18,55	24,00	29,00	24,11	19,11	19,33	24,55	19,67	18,00	23,89	29,00	23,33	24,55	23,33	28,33
14/05/2019	9	18,50	24,78	28,78	23,00	18,55	18,00	23,39	18,78	18,44	24,33	28,10	23,67	23,70	23,80	29,33
21/05/2019	10	19,55	24,00	28,89	18,78	19,67	19,67	19,11	19,22	18,00	23,93	28,40	23,89	23,89	23,12	-
28/05/2019	11	18,67	24,67	28,45	15,00	19,89	20,11	25,33	19,33	18,89	24,00	-	23,89	24,67	24,33	28,78
04/06/2019	12	18,67	23,89	28,67	24,11	-	-	-	19,22	18,00	24,10	29,33	23,56	23,78	24,78	28,22
11/06/2019	13	18,56	23,89	29,11	23,78	18,11	18,00	14,10	18,80	14,45	23,56	28,33	24,00	23,33	-	29,56
18/06/2019	14	19,33	23,56	28,40	14,78	19,56	18,56	25,67	18,45	18,45	24,67	29,22	16,00	24,45	-	28,78
25/06/2019	15	18,45	23,11	28,00	23,45	18,00	18,00	23,00	18,11	18,60	23,00	29,30	23,00	23,10	23,90	-
02/07/2019	16	19,56	23,00	28,89	-	18,89	19,11	23,67	18,56	18,90	23,20	28,00	23,22	23,40	23,30	18,00
09/07/2019	17	18,78	23,00	29,20	25,89	18,00	19,67	25,44	15,89	19,30	23,89	28,00	25,00	24,78	24,67	28,40
16/07/2019	18	20,44	25,44	30,44	14,33	20,55	19,44	23,78	19,22	19,00	23,11	-	18,78	24,11	23,00	18,00
23/07/2019	19	18,89	24,89	30,44	25,22	18,78	18,33	23,11	18,11	18,67	24,22	28,00	24,00	23,78	23,44	19,11
30/07/2019	20	18,67	24,41	29,00	23,78	18,30	18,11	25,55	19,22	18,55	25,55	29,00	24,55	23,67	23,44	-
06/08/2019	21	19,89	23,67	28,89	24,00	20,22	20,33	25,78	19,44	18,11	24,67	28,33	23,78	23,78	25,67	29,00
13/08/2019	22	19,22	24,00	29,11	23,44	20,22	19,33	25,67	19,55	18,78	23,33	-	24,11	23,67	23,00	28,44
20/08/2019	23	19,11	24,11	29,00	15,44	-	19,22	26,56	19,44	-	24,11	29,22	26,22	25,00	24,56	29,11
27/08/2019	24	20,00	25,11	30,00	23,67	19,89	19,56	25,22	19,78	20,22	23,89	28,11	19,00	24,78	23,78	30,50
03/09/2019	25	20,22	23,56	-	24,44	18,78	19,78	24,22	19,67	28,22	23,56	28,56	23,33	23,89	-	28,22
10/09/2019	26	18,59	23,11	30,00	24,55	19,11	20,55	23,22	19,55	18,00	23,00	28,33	24,11	23,80	14,55	28,22
17/09/2019	27	21,11	24,55	29,60	23,33	20,55	18,44	26,11	18,00	28,67	24,55	-	23,89	25,55	25,11	28,22
24/09/2019	28	20,89	24,33	-	23,67	20,00	-	26,33	20,67	-	24,33	28,67	25,44	26,55	24,89	26,55
01/10/2019	29	18,10	23,67	28,89	23,00	18,33	19,67	25,44	20,33	18,44	23,00	29,89	24,11	23,33	23,00	-
08/10/2019	30	-	25,55	29,00	24,89	18,78	20,22	25,11	19,00	18,67	25,33	29,33	25,55	24,55	24,44	30,78
15/10/2019	31	-	-	-	24,67	19,89	19,11	26,55	-	29,00	24,89	28,55	23,33	24,67	25,33	30,11

Anexo 30: Datos del monitoreo de la concentración de HTP a los 0 y 240 días. Fuente: (CEINPET, 2020; LEA, 2020).

Tiempos Tratamientos	Concentración de HTP (mg/kg)		
	0	240	
	Teórico*	CEAC	CEINPET
T1	39 326	11 800	11 478
T 2	30 587	10 400	10 345
T 3	30 587	9 700	20 380
T 4	30 587	10 000	547
T 5	21 848	11 000	3 864
T 6	30 587	7 880	24 585
T 7	39 326	9 800	9 655
T 8	30 587	12 200	7 091
T 9	21 848	4 600	3 497
T 10	39 326	8 020	8 682
T 11	30 587	7 940	8 715
T 12	21 848	4 900	6 299
T 13	30 587	5 980	12 963
T14	21 848	1 420	12 303
T15	39 326	5 260	15 739

Teórico*: Valores del diseño calculados a partir del balance de masa y los resultados de la caracterización inicial del residuo petrolizados mostrados en la tabla 5 del epígrafe 3.1.2.

Anexo 31: Datos de las variables climáticas monitoreadas en las 31 semanas que fueron estudiadas las unidades experimentales. Fuente: (INSMET, 2020).

Semanas	Temperatura media (C ⁰)	Humedad relativa media (%)	Precipitaciones acumuladas (mm)	Vientos (km/h)
1	23,2	72	10	3,4
2	22,8	72	20,8	6
3	24,8	69	17,6	4,1
4	23,8	75	216,5	4,9
5	24,7	77	27,6	3,8
6	24,3	75	0,1	2,7
7	24,1	79	18	3,6
8	26,4	76	33,1	2,2
9	25,4	81	54,3	2,2
10	25,4	76	17	3,6
11	25,7	79	53,1	3
12	26,5	79	63,7	1,9
13	26,8	75	13,2	2,2
14	26,9	78	52,7	3
15	27,2	74	11	4,3
16	26,8	77	9,7	2,1
17	26,1	77	37,8	4
18	27,2	75	16	4,7
19	26,8	78	59,3	2,5
20	26,3	83	96,4	2
21	26,5	81	101,1	2,4
22	25,9	81	54,8	2,3
23	25,6	83	53,1	1,8
24	25,6	84	39,7	1,5
25	25,7	82	18,8	2
26	26,5	81	95,9	2,9
27	25,2	83	45,5	2,7
28	25,4	85	34,5	2,3
29	24,5	89	102,4	2,9
30	25,3	84	132,7	2,5
31	25,4	85	5,8	2,7

Anexo 32: Comprobación del supuesto de los datos de temperatura de las unidades experimentales, así como de las variables climáticas: temperatura media ambiental, humedad media relativa, precipitaciones acumuladas y vientos. Fuente: Elaboración propia

Los supuestos de las variables temperatura de las unidades experimentales son: normalidad, varianza constante e independencia los cuales se comprueban a continuación:

Normalidad:

En tabla 1 se muestra el Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada para cada una de las 15 corridas experimentales. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, las cuales tenderían a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos que se aplicaron a estos datos.

Tabla 1: Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada arrojados por el Resumen Estadístico del Análisis Multivariado. Fuente Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010) .

Tratamientos	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
T1	-1,13823	-0,246137
T2	-1,01119	-1,2226
T3	-0,717444	-1,35955
T4	-0,657344	-1,45416
T5	-0,744669	-1,71085
T6	-0,645494	-1,61698
T7	-0,883197	-1,41691
T8	-0,517745	-1,68106
T9	-0,243826	-1,30116
T10	-0,692853	-1,69843
T11	-0,246113	-1,93008
T12	-0,498324	-1,60961
T13	-0,953204	-1,55439
T14	-0,734122	-1,48294
T15	-0,18192	-1,84896

Ninguno de los tratamientos muestra valores de Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada fuera del rango -2 a +2, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal con un 95 % de confianza.

Varianza constante:

En la figura 1 se muestran los residuos frente a los valores de predicho.

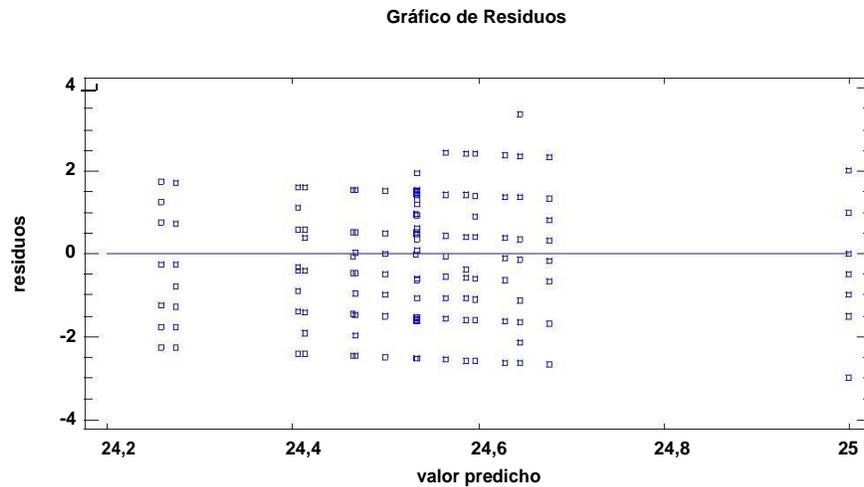


Figura 1: Residuos frente a los valores predichos de temperatura. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede observar en la figura 1 los puntos se distribuyen a lo largo de una banda horizontal de manera aleatoria sin ningún patrón contundente. Para contrastar la verificación del supuesto se utiliza la gráfica de Niveles de Factor vs. Residuos, la cual se muestran en la figura 2:

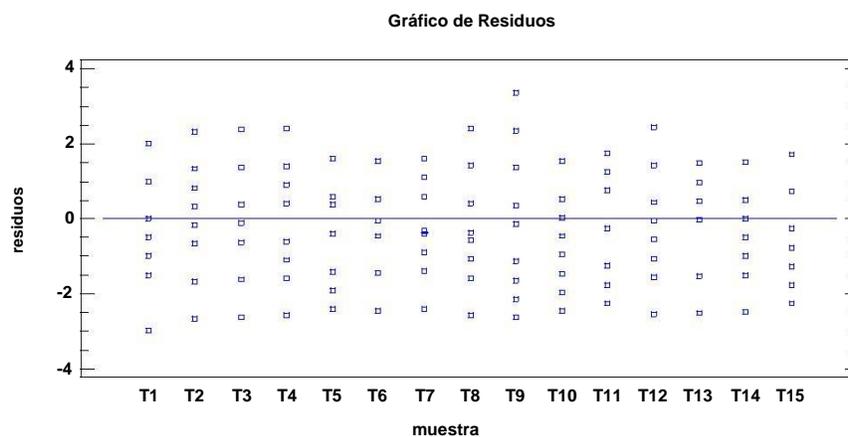


Figura 2: Residuos vs. niveles del factor temperatura. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede verificar en las figuras precedentes la variabilidad dentro de cada nivel de tratamiento es aproximadamente la misma, por lo que se concluye que se cumple con el supuesto de igualdad de varianza.

Independencia:

En la figura 3 se muestra la gráfica de residuos vs. número de observaciones de temperaturas.

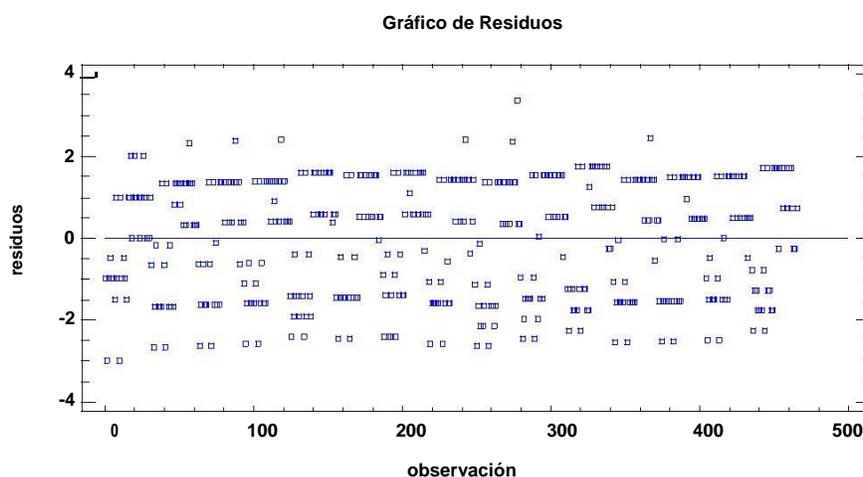


Figura 3: Gráfica de residuos vs. número de observaciones de temperaturas. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Tecnologías, 2010).

Como se puede apreciar no existe ningún patrón diferente a una dispersión aleatoria, por tanto, se cumple el supuesto de independencia

Se comprobó el cumplimiento de la normalidad de las variables climáticas: temperatura media ambiental, humedad media relativa, precipitaciones acumuladas y vientos como se muestra a continuación:

Normalidad:

En tabla 2 se muestra el Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada para cada una de las variables climáticas. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, las cuales tenderían a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos que se aplicaron a estos datos.

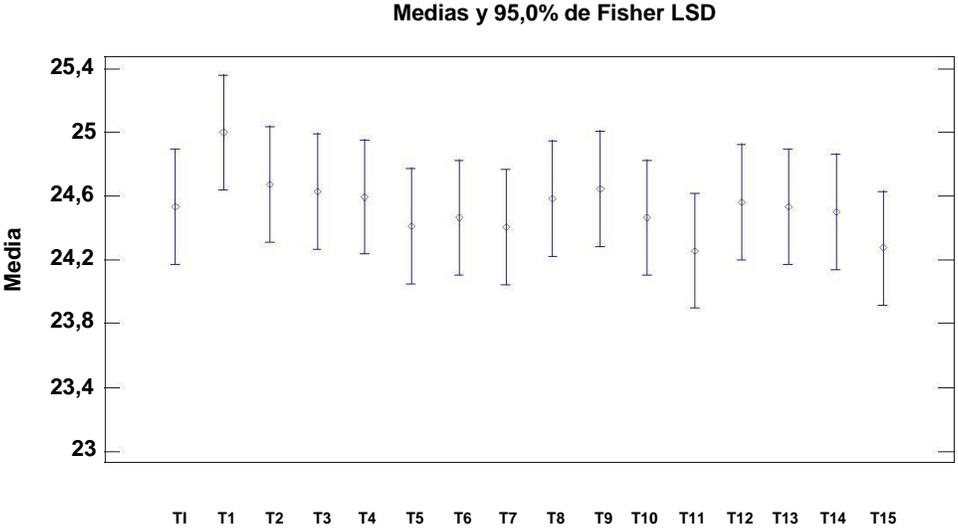
Tabla 2: Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada arrojados por el Resumen Estadístico de la Comparación de Varias Muestras . Fuente Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Variables climáticas	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Temperatura media ambiental	-1,54236	0,00840845
Humedad media relativa	0,020621	-0,307334
Viento	4,4483	5,71982
Precipitación acumulada	2,48875	1,10689

Las variables temperatura media ambiental y humedad relativa muestran valores de Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada dentro del rango -2 a +2, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal con un 95 % de confianza.

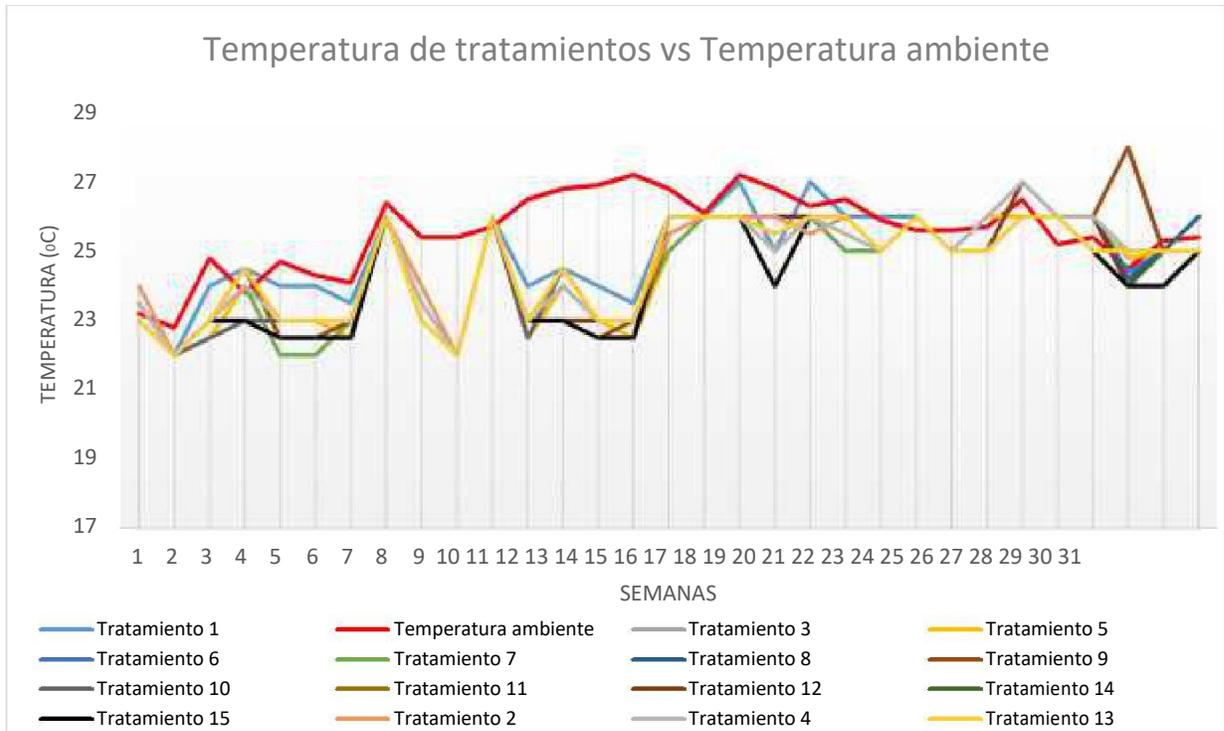
Por otra parte, las variables precipitación acumulada y viento presentan valores de Sesgo Estandarizado fuera del rango esperado y la variable precipitación acumulada muestra valores de la Curtosis Estandarizada fuera del rango esperado por lo que se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal con un 95 % de confianza.

Anexo 33: Grafica de media de las temperaturas de los 15 tratamientos y la temperatura intratratamientos. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Tecnologies, 2010)



TI: Temperatura intratratamientos.

**Anexo 34: Temperatura de los 15 tratamientos vs temperatura ambiental. Fuente
Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).**



Anexo 35: Matriz de correlaciones entre la temperatura de los tratamientos, la temperatura intratratamientos y las variables ambientales: temperatura media ambiente, humedad media relativa, precipitación acumulada y viento. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

	Temperatura intratratamientos	Temperatura ambiente	Humedad relativa	Precipitación acumulada	Viento
Tratamiento 1 T	0,9572	0,4857	0,4853	0,2012	-0,4471
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0056	0,0057	0,2777	0,0117
Tratamiento 2 T	0,9784	0,4230	0,4998	0,2645	-0,4427
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0177	0,0042	0,1505	0,0126
Tratamiento 3 T	0,9848	0,4539	0,4628	0,1882	-0,4682
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0103	0,0088	0,3107	0,0079
Tratamiento 4 T	0,9924	0,4334	0,5288	0,2186	-0,4482
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0149	0,0022	0,2375	0,0114
Tratamiento 5 T	0,9783	0,3988	0,5493	0,2211	-0,4297
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0262	0,0014	0,2320	0,0158
Tratamiento 6 T	0,9871	0,4513	0,5158	0,2437	-0,4217
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0108	0,0030	0,1865	0,0181
Tratamiento 7 T	0,9726	0,4538	0,4866	0,2303	-0,4153
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0103	0,0055	0,2127	0,0202
Tratamiento 8 T	0,9821	0,4737	0,5227	0,0987	-0,4826
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0071	0,0026	0,5973	0,0060
Tratamiento 9 T	0,9153	0,2977	0,6239	0,3404	-0,3716
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,1039	0,0002	0,0609	0,0395
Tratamiento 10 T	0,9789	0,4875	0,4872	0,1049	-0,4788
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0054	0,0054	0,5744	0,0064
Tratamiento 11 T	0,9790	0,4630	0,4623	0,1394	-0,4250
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0087	0,0088	0,4544	0,0172
Tratamiento 12 T	0,9760	0,4331	0,4600	0,2790	-0,3932
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0149	0,0092	0,1285	0,0287
Tratamiento 13 T	0,9783	0,4724	0,4806	0,2840	-0,4177

	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0073	0,0062	0,1215	0,0194
Tratamiento 14 T	0,9844	0,4866	0,4382	0,2056	-0,4483
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0055	0,0137	0,2672	0,0114
Tratamiento 15 T	0,9695	0,4294	0,4538	0,1176	-0,4311
	(31)	(31)	(31)	(31)	(31)
	0,0000	0,0159	0,0103	0,5287	0,0155
Temperatura intratratamientos		0,4528	0,5118	0,2154	-0,4457

Esta tabla muestra las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor -P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P por debajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95 %.

Anexo 36: Análisis de regresión lineal múltiple temperatura intratratamientos vs temperatura ambiente y humedad relativa. Fuente: Elaboración propia, utilizando software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Variable dependiente: temperatura intratratamientos (°C).

Variables independientes: temperatura ambiente (°C) y humedad relativa (%).

Tabla 1: Coeficientes del modelo. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

	Mínimos cuadrados	Error	Estadístico	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	1,08053	5,45435	0,198104	0,8444
Temperatura ambiente	0,479142	0,181323	2,64247	0,0133
Humedad relativa	0,142004	0,045647	3,11092	0,0043

Tabla 2: Análisis de Varianza para la regresión Lineal. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	24,2901	2	12,1451	9,70	0,0006
Residuo	35,0658	28	1,25235		
Total (Corr.)	59,356	30			

Estadísticos del modelo:

R-cuadrada = 40,9228 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 36,703 porciento

Error estándar del est. = 1,11908

Error absoluto medio = 0,893894

Estadístico Durbin-Watson = 1,73218 (P=0,1402)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,117697

Puesto que el valor-P del ANOVA en la tabla 2 es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa de temperatura intratratamientos con respecto a la temperatura y humedad relativa ambiente con un nivel de confianza del 95 %.

El estadístico R-cuadrada indica que el modelo ajustado explica 40,9228 % de la variabilidad en temperatura intratratamientos. Si bien, los valores de R-cuadrado no se consideran altos respecto a otras aplicaciones de ingeniería, logran justificar casi la mitad de la variación existente en la temperatura de en un proceso que además se encuentra influenciado por otros parámetros como pueden ser: actividad metabólica de los microorganismos; régimen de homogenización, aireación y volteo; frecuencia de humectación, entre otros factores no estudiados. Por tanto, se considera válida la ecuación del modelo ajustado como herramienta de monitoreo y estimación de la temperatura de las biopilas a escala de banco.

La ecuación del modelo = $1,08053 \text{ajustado} + 0,479142 \text{laecuación} \cdot 1 + 0,142004 \cdot$ (1)
Donde:

TI: Temperatura intratratamientos ($^{\circ}\text{C}$).

X1: Temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$).

X2: Humedad media relativa (%).

Supuestos del modelo:

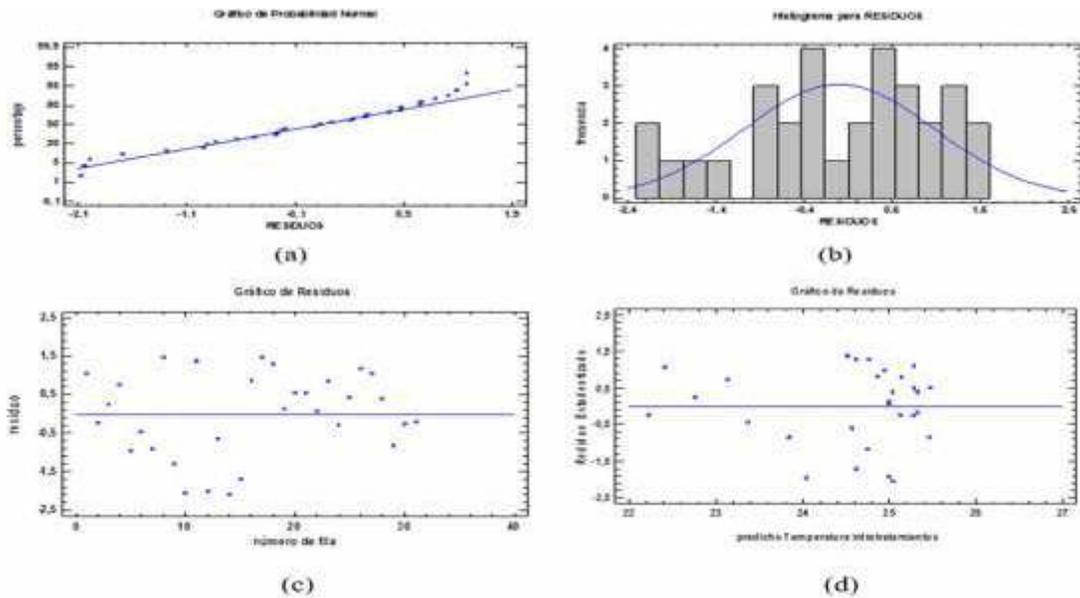


Figura 1: Análisis de supuestos de la regresión múltiple temperatura intratratamientos vs. temperatura ambiente y humedad relativa media a) gráfica de probabilidad normal b) histograma de frecuencia ajustado a la campana de Gauss (normalidad) c) Residuos vs. Número de fila. (Independencia) d) Residuos vs. Predicho (Igualdad de varianza).Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centuri ón versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

De un mero análisis gráfico se observan en las figuras 1 (a) y (b) un buen ajuste a la distribución normal . En las figuras 1 (c) y (d) se comprueba que no existen patrones que indiquen falta de aleatoriedad. Por tanto, se cumplen los supuestos del modelo de regresión lineal múltiple .

Anexo 37: Comprobación de los supuestos de los datos de humedad de las unidades experimentales. Fuente: Elaboración propia .

Normalidad:

En tabla 1 se muestra el Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada para cada una de las 15 corridas experimentales. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, las cuales tenderían a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos que se aplicaron a estos datos.

Tabla 1: Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada arrojados por el Resumen Estadístico de la Comparación de Varias Muestras. Fuente Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Tratamientos	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
T1	1,8424	0,0220532
T2	1,3187	-0,483907
T3	0,0594741	0,282551
T4	1,99743	0,359427
T5	0,0228719	-1,44245
T6	0,659887	-0,981646
T7	1,38299	0,422997
T8	-1,26476	1,03228
T9	0,726138	-0,994042
T10	1,44727	-0,460494
T11	0,96909	-0,70744
T12	1,88855	0,00672251
T13	0,764008	-0,53974
T14	1,55067	-0,670551
T15	1,8044	-0,238949

Ninguno de los tratamientos muestra valores de Sesgo Estandarizado y la Curtosis Estandarizada fuera del rango -2 a +2, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal con un 95 % de confianza.

Varianza constante:

En la figura 1 se muestran la gráfica de Niveles de Factor vs Residuos

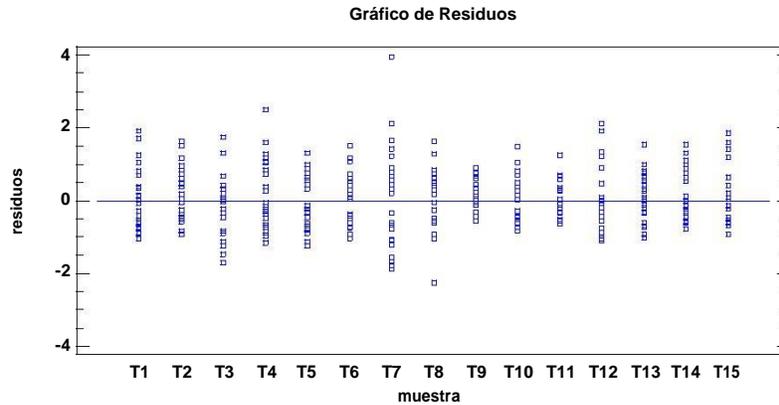


Figura 1: Residuos vs. niveles del factor humedad. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede observar en la figura 1 la variabilidad de los residuos dentro de cada nivel de tratamiento es aproximadamente la misma, por lo que se cumple con el supuesto de igualdad de varianza.

Independencia:

En la figura 2 se muestra la gráfica de residuos vs. número de observaciones de humedad.

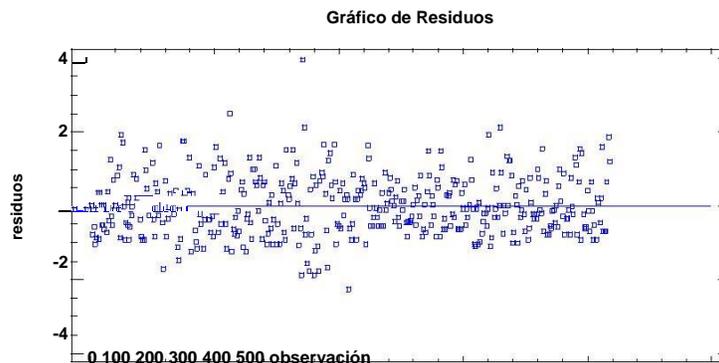


Figura 2: Gráfica de residuos vs. número de observaciones de humedad. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede apreciar no existe ningún patrón diferente a una dispersión aleatoria, por tanto, se cumple el supuesto de independencia.

Anexo 38: Análisis para la identificación de valores atípico. Fuente: Elaboración propia, utilizando software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

La Gráfica de Aberrantes mostrado en la figura 1 es una buena alternativa para comenzar a identificar valores atípicos.

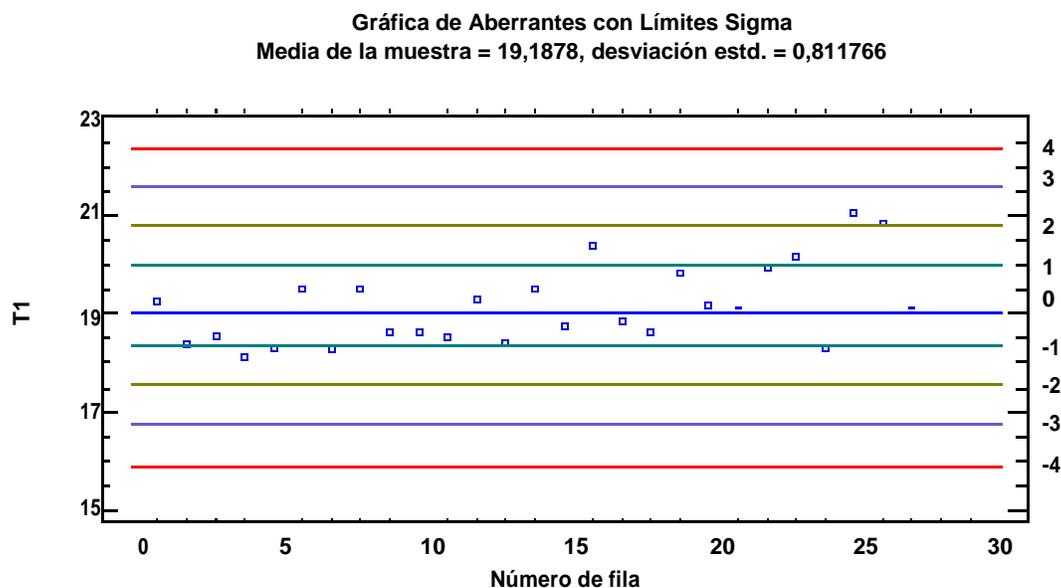


Figura 1: Gráfica de Aberrantes. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Este gráfico muestra cada valor de los datos junto con líneas horizontales en la media muestral más y menos 1, 2, 3, y 4 desviaciones estándar. Puntos más allá de 3 sigma de los cuales hay 0, se considera que son valores atípicos potenciales y dignos de investigación adicional. También se tuvo en cuenta la tabla 1 que muestra las 5 observaciones mayores y las 5 menores en los datos.

Tabla 1: Tabla de valores extremos. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

		Valores Estudentizados	Valores Estudentizados	Modificados
Fila	Valor	Sin Supresión	Con Supresión	Valor-Z DAM
4	18,14	-1,29074	-1,36039	-1,29504
7	18,3	-1,09364	-1,14124	-1,0792
24	18,33	-1,05668	-1,10084	-1,03873
5	18,33	-1,05668	-1,10084	-1,03873
2	18,41	-0,95813	-0,994054	-0,93081

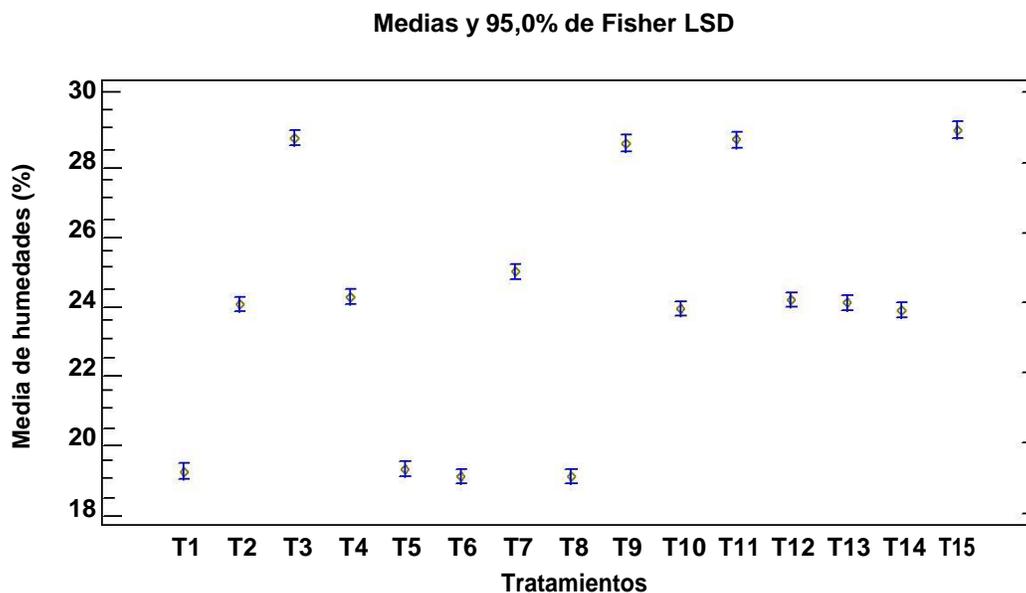
...				
22	20,0	1,00056	1,03987	1,2141
23	20,22	1,27158	1,33879	1,51088
16	20,44	1,54259	1,65124	1,80766
26	20,89	2,09694	2,35178	2,41471
25	21,11	2,36795	2,73718	2,71149

Las tres columnas de la derecha muestran valores estandarizados o Puntajes Z que pueden ayudar a identificar valores atípicos. Los valores Estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 19,1878. El valor más extremo se encuentra en la observación 25, el cual es 2,71149 desviaciones estándar de la media. Valores de las calificaciones modificadas mayores que 3,5 en valor absoluto, de las cuales hay 0 bien podrían ser observaciones aberrantes.

Se realizó la prueba de Grubbs también llamada Prueba de la Desviación Estudentizada Extrema (ESD), se basa en el mayor valor Estudentizado, en este caso es el de la observación 25 como se había visto, obteniéndose a partir de este el valor P de la prueba de Grubbs de 0,341858. Puesto que el valor P de la prueba de Grubbs es mayor que 0,05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5,0 %.

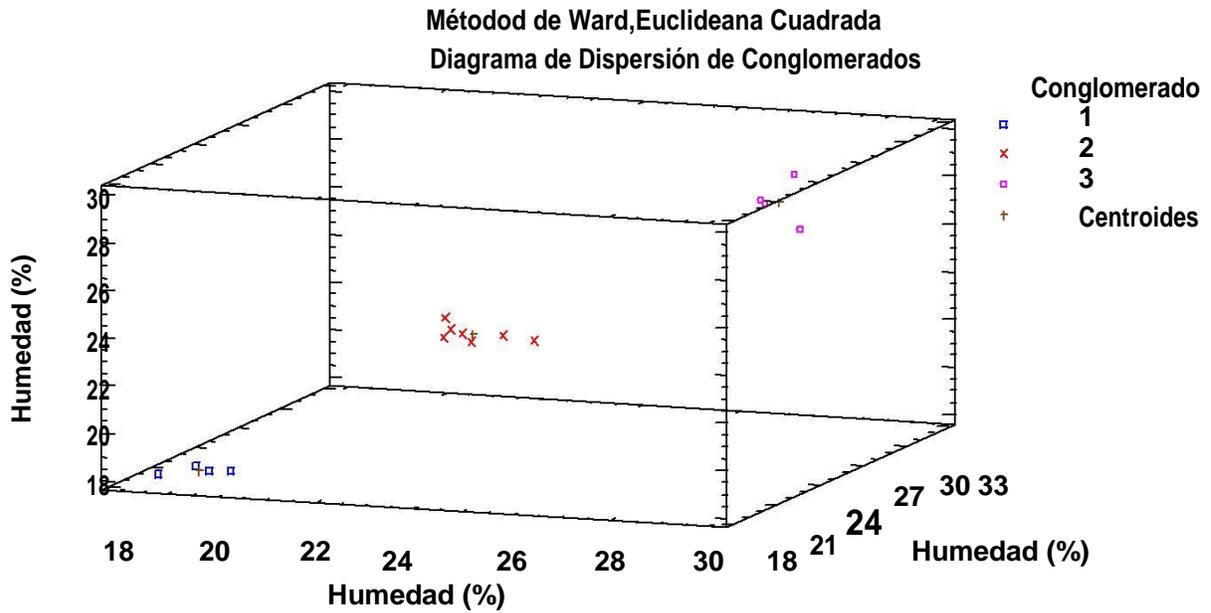
Los resultados de estas tres pruebas realizadas coinciden en que ninguna de las observaciones de este tratamiento podría ser un valor aberrante.

Anexo 39: Gráfico de media de la humedad de los 15 tratamientos. Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010)

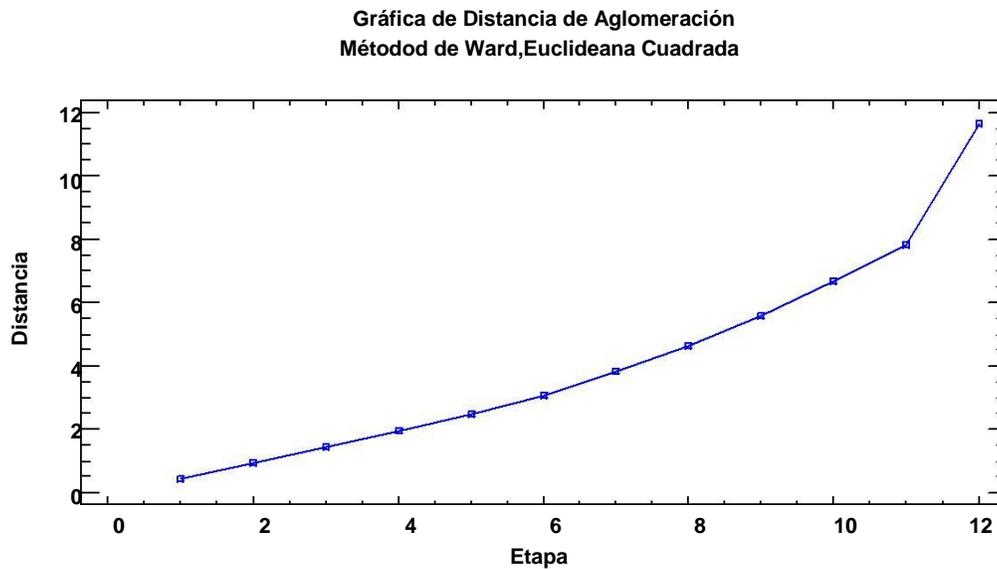


En la gráfica se observa cómo los tratamientos se dividen en tres grupos el primero formado por los tratamientos 1, 5, 6 y 8 cuya humedad media ronda alrededor del 19%; el segundo formado por los tratamientos 2, 4, 7, 10, 12, 13 y 14 cuya humedad media ronda alrededor del 24% y el tercer grupo formado por los tratamientos 3, 9, 11 y 15 cuya humedad media ronda alrededor del 29%.

Anexo 40: (a) Diagrama de Dispersión de Conglomerados y (b) Gráfica de distancia de aglomeración. Fuente: elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

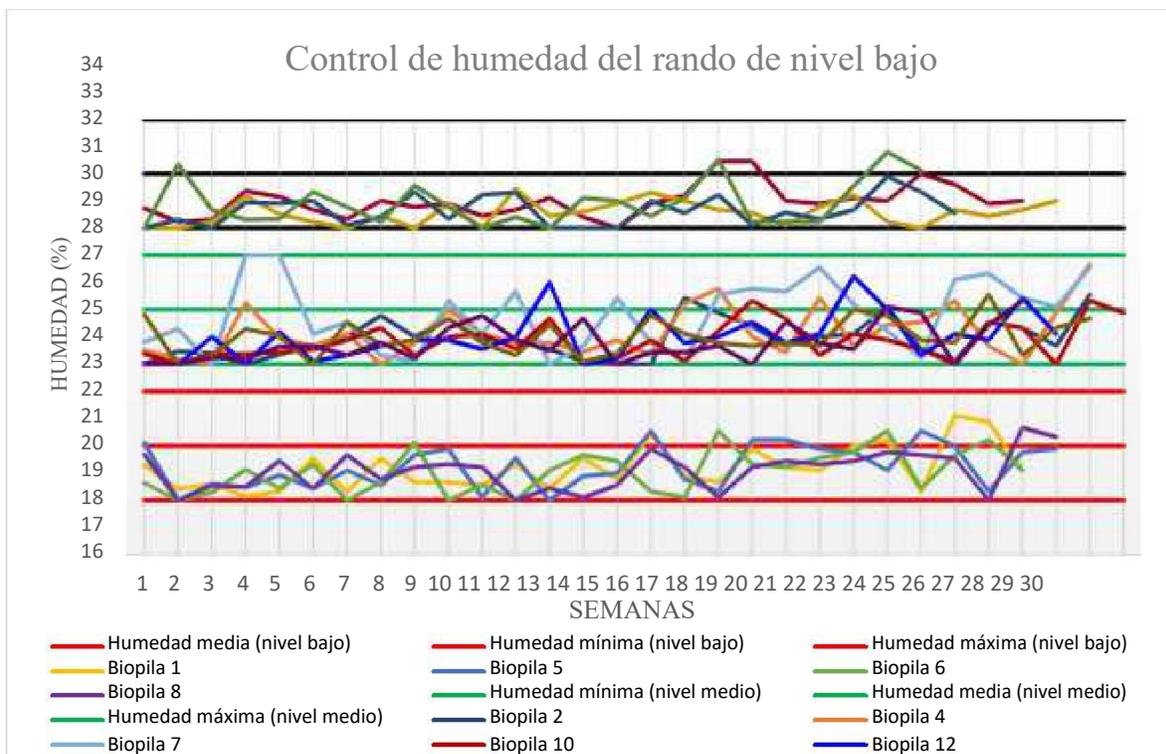


(a)



(b)

Anexo 41: Gráfico que muestra la humedad de los 15 tratamientos en las diferentes observaciones semanales realizadas durante el monitoreo. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).



Anexo 42: Datos primarios de concentración de HTP, y resultados de los cálculos de % R y masa de HTP removida. Fuente: Elaboración propia, a partir de resultados de la concentración de HTP arrojados por LEA (2020) y CEINPET (2020).

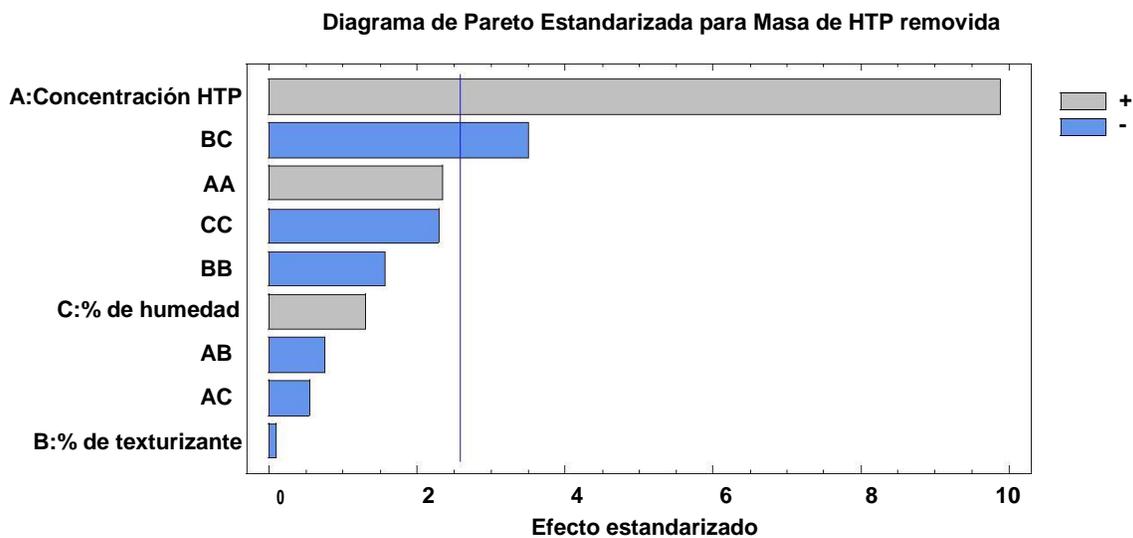
Tratamiento	Concentración de HTP_(t=0) (mg/kg)	Concentración media de HTP_(t=240) (mg/kg)	% R	Masa de HTP removida (kg)
T1	39326,33	11639	70,40	1,05
T2	30587,14	10372,5	66,09	0,77
T3	30587,14	15040	50,83	0,59
T4	30587,14	5273,5	82,76	0,96
T5	21847,96	7432	65,98	0,55
T6	30587,14	16232,5	46,93	0,55
T7	39326,33	9727,5	75,26	1,12
T8	30587,14	9645,5	68,47	0,80
T9	21847,96	4048,5	81,47	0,68
T10	39326,33	8351	78,76	1,18
T11	30587,14	8327,5	72,77	0,85
T12	21847,96	5599,5	74,37	0,62
T13	30587,14	9471,5	69,03	0,80
T14	21847,96	6861,5	68,59	0,57
T15	39326,33	10499,5	73,30	1,10

Anexo 43: Matriz de Correlación para los Efectos Estimados. Fuente: Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1	promedio	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,55	0,00	0,00	-0,55	0,00	-0,55
2	A: Concentración HTP	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00
3	B: % de texturizante	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
4	C: % de humedad	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	AA	-0,55	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08
6	AB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	AC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
8	BB	-0,55	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	1,00	0,00	0,08
9	BC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
10	CC	-0,55	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,08	0,00	1,00

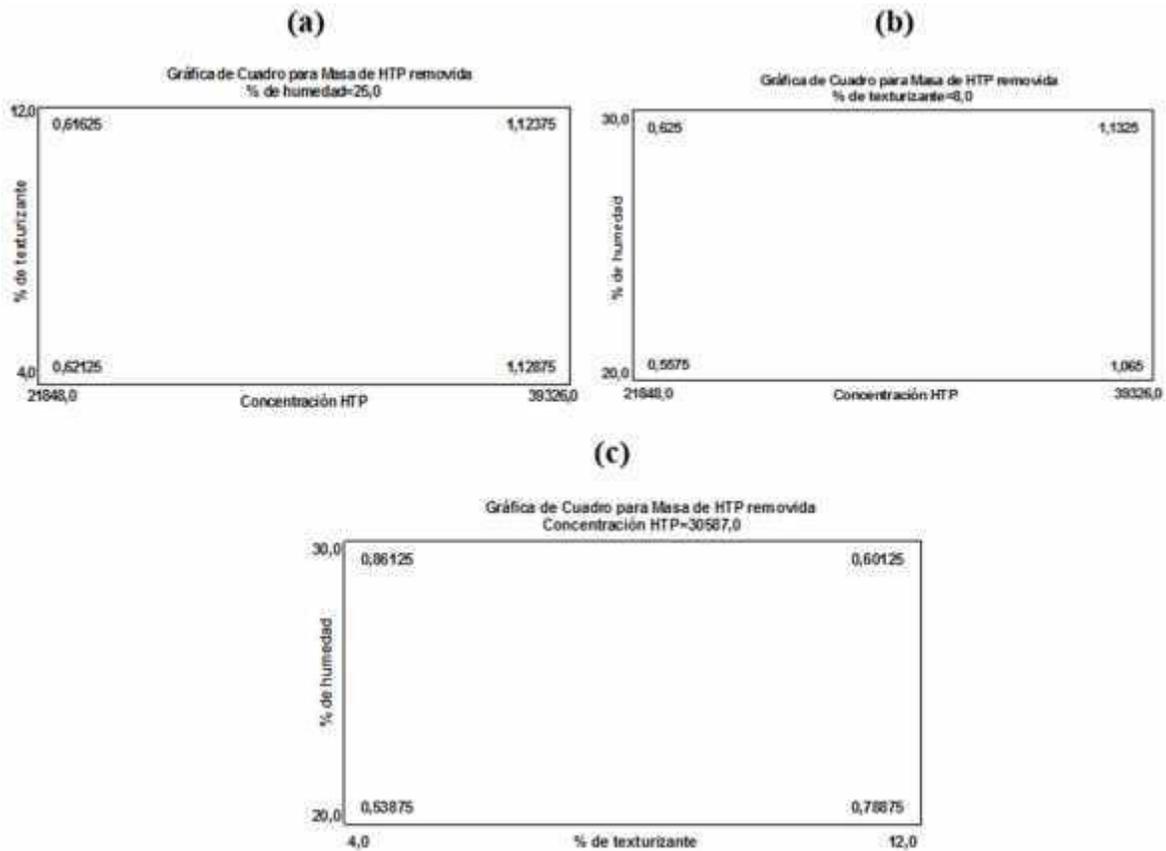
En este caso, hay 3 pares de efectos con interacción distinta de cero. No obstante, como ninguna es mayor o igual que 0,5, probablemente será capaz de interpretar los resultados sin mucha dificultad.

Anexo 44: Diagrama de Pareto Estandarizada para la masa de HTP removida.
Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).



Cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a efectos estadísticamente significativos con un 95,0 % de nivel de confianza, en este caso, se corroboró el resultado del ANOVA, los efectos A y BC son estadísticamente significativos.

Anexo 45: Gráficas de Cuadrado para masa de HTP removida, (a) mantenido el factor % de humedad en su nivel medio, (b) mantenido el factor % de texturizante en su nivel medio y (c) manteniendo el factor concentración inicial de HTP en su nivel medio . Fuente: Elaboración propia, salida del soft ware Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).



Estas gráficas mantiene uno de los tres factores en su nivel medio y los otros dos en el sus niveles alto o bajo, en las mismas se puede observar como los menores valores de la masa de HTP removida se obtienen para el factor concentración de HTP en su nivel bajo y medio independientemente de los niveles do los otro dos factores.

En este caso el mayor valor de la variable de respuesta se observa en la gráfica (b) el cuál mantiene el % de texturizante en su nivel medio, y los otros dos factores en sus niveles altos. También en la gráfica (a) se puede observar que al mantener el % de humedad y la concentración inicial de HTP en sus niveles medio y nivel alto la masa de HTP removida permanece practicamente cconstante al variar el factor % de texturrizante de sunivel bajo a su nivel alto.

Anexo 46: Análisis de la variable de respuesta del diseño: concentración de HTP final.
Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

La tabla 1 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y sus interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo, así como el factor de inflación de varianza (V.I.F.)

Tabla 1: Efectos estimados para concentración de HTP final (mg/kg). Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	8372,5	1110,37	
A: Concentración HTP	4068,88	1359,92	1,00
B: % de texturizante	60,0	1359,92	1,00
C: % de humedad	-1758,38	1359,92	1,00
AA	-4644,25	2001,74	1,01
AB	1319,25	1923,21	1,00
AC	1122,0	1923,21	1,00
BB	3169,0	2001,74	1,01
BC	6649,75	1923,21	1,00
CC	4708,75	2001,74	1,01

Se observa en la tabla 1 que el valor del V.I.F más grande, es igual a 1,01 y les corresponde a las interacciones cuadráticas (AA, BB y CC) por lo que estamos en presencia de un diseño perfectamente ortogonal. Factores de 10 o más de los cuales no hay 0 normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

La tabla 2 muestra el ANOVA. En la misma está particiona la variabilidad de la concentración de HTP final en piezas separadas para cada uno de los efectos, además prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

Tabla 2: Análisis de Varianza para la concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Concentración HTP	3,31115E7	1	3,31115E7	8,95	0,0304
B: % de texturizante	7200,0	1	7200,0	0,00	0,9665

C: % de humedad	6,18377E6	1	6,18377E6	1,67	0,2525
AA	1,99099E7	1	1,99099E7	5,38	0,0680
AB	1,74042E6	1	1,74042E6	0,47	0,5232
AC	1,25888E6	1	1,25888E6	0,34	0,5849
BB	9,27006E6	1	9,27006E6	2,51	0,1742
BC	4,42192E7	1	4,42192E7	11,96	0,0181
CC	2,04668E7	1	2,04668E7	5,53	0,0654
Error total	1,84937E7	5	3,69874E6		
Total (corr.)	1,58102E8	14			

En este caso, los efectos concentración de HTP (A) y la interacción % de texturizantes y % de humedad (BC) tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0 %.

El Diagrama de Pareto de la figura 1 muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. Esto es equivalente a calcular un estadístico - t para cada efecto. La línea vertical puede utilizarse para juzgar cuáles efectos son estadísticamente significativos. De esta forma se corroboró la información de la tabla 2.

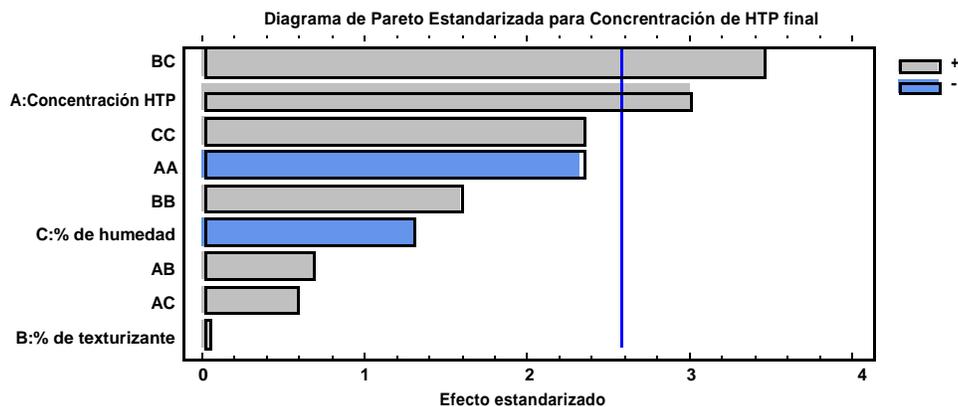


Figura 1: Diagrama de Pareto Estandarizada para la concentración de HTP final.
Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a efectos estadísticamente significativos con un 95,0 % de nivel de confianza, en este caso, se corroboró el resultado del ANOVA, los efectos BC y A son estadísticamente significativos.

De acuerdo a lo planteado en materiales y métodos se comenzaron a depurar los coeficientes que no fueron significativos en el modelo. Siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 2.7.1. Las interacciones AC y AB se eliminaron al ser las interacciones que menos influencias tenían sobre la variable de respuesta analizada según su valor-P; además se incrementó el valor del R^2_{aj} y se logró un mayor número de términos (efectos) significativos en el modelo como es el caso de las interacciones cuadráticas AA y CC. De esta forma se obtuvo el ANOVA mejorado que se observa en la tabla 3.

Tabla 3: Análisis de Varianza mejorado para la concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Concentración inicial de HTP	3,31115E7	1	3,31115E7	10,78	0,0134
B: % de texturizante	7200,0	1	7200,0	0,00	0,9627
C: % de humedad	6,18377E6	1	6,18377E6	2,01	0,1988
AA	1,99099E7	1	1,99099E7	6,48	0,0383
BB	9,27006E6	1	9,27006E6	3,02	0,1259
BC	4,42192E7	1	4,42192E7	14,40	0,0068
CC	2,04668E7	1	2,04668E7	6,67	0,0364
Error total	2,1493E7	7	3,07043E6		
Total (corr.)	1,58102E8	14			

Los efectos de primer orden % de texturizante (B) y % de humedad (C) a pesar de no ser significativos se mantuvieron puesto que fue necesario obtener un modelo jerárquico .

En el caso de la interacción cuadrática BB se mantuvo en el modelo a pesar de no ser significativa porque al depurarla, el R^2_{aj} del modelo disminuye.

En la figura 2 se muestra el Diagrama de Pareto Estandarizado construido a partir del ANOVA mejorado, en el cual se representan los efectos divididos entre su error estándar en orden decreciente de importancia.

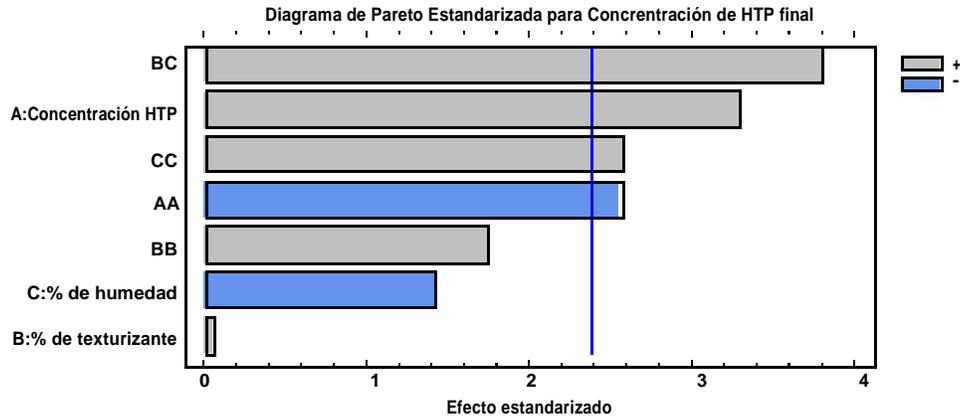


Figura 2: Diagrama de Pareto Estandarizada para la concentración de HTP final . Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se corroboró el resultado del ANOVA mejorado al observar en el Diagrama de Pareto de la figura 2 cuatro efectos significativos: A, BC, AA y CC, y tres efectos no significativos como BB, C y B.

En la figura 3 se observa la Gráfica de Efectos Principales, la cual muestra los estimados de la concentración de HTP final como una función de cada factor experimental. En cada gráfica, el factor de interés se varía de su nivel bajo a su nivel alto, mientras que los demás factores se mantienen constantes en sus valores centrales.

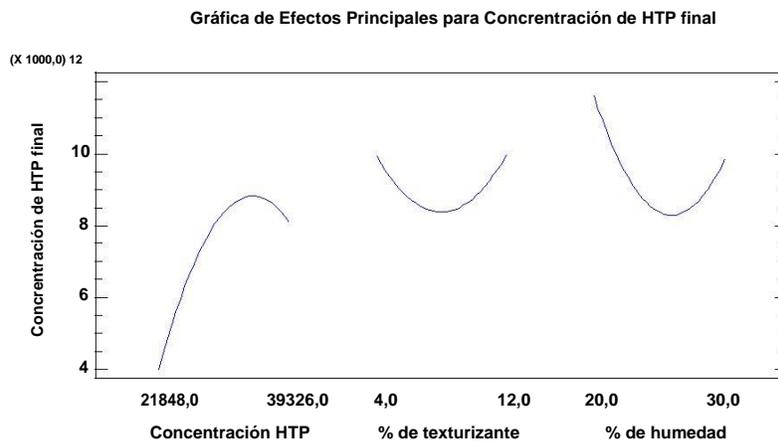


Figura 3: Gráfica de Efectos Principales para la concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se observó en la figura 3 los efectos de los factores A (Concentración de HTP) y C (% de humedad) son mayores que el efecto del factor B (% de texturizante), pues al aumentar los niveles de los factores A y C aumenta mucho más la variabilidad de la respuesta que al aumentar el nivel del factor B.

En figura 4 se observa la Gráfica de Interacción donde se muestra el estimados de concentración de HTP final en función de 1 par de factores % de texturizante y % de humedad, interacción BC, al ser la interacción entre ambos significativa en el modelo . Se varía el factor B de su nivel bajo a su nivel alto. En una línea, el factor C se mantiene en su nivel bajo, en la otra línea, el factor C se mantiene a su nivel alto. El factor A en este caso se mantuvo constantes en su nivel medio.

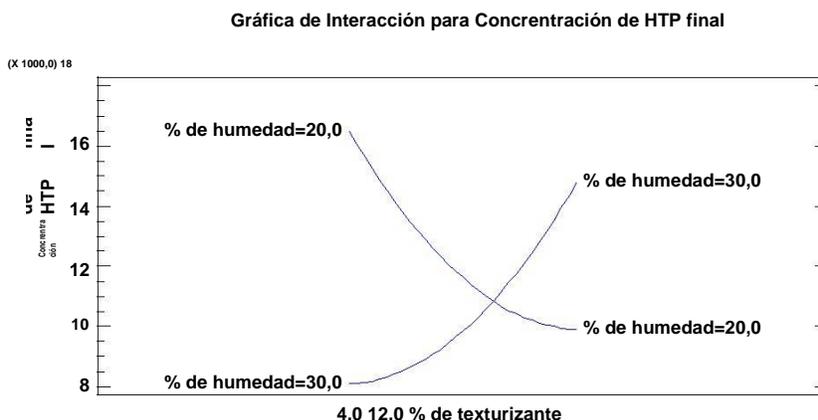


Figura 4: Gráfica de Interacción para concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

En la figura 4 se aprecia que el efecto de la interacción BC, en el cual se observa que para obtener menor concentración de HTP, el efecto de disminuir el nivel del factor % de texturizante (B) es positivo siempre y cuando el factor % de humedad (C) se mantenga en su nivel alto (30 %) porque si C está en su nivel bajo al disminuir B ocurre un efecto negativo (se obtienen una mayor concentración de HTP final). Del mismo modo es positivo (disminuye la concentración de HTP final) disminuir el nivel del factor B manteniendo C en su nivel alto (30 %).

De esta forma, se busca el punto (extremo de la curva) más bajo con respecto a la escala de concentración de HTP final y se obtiene que los niveles para los factores B y C que logran la menor concentración de HTP final son B en su nivel bajo (4 %) y C en su nivel alto (30 %).

La tabla 4 contiene información acerca de los valores de concentración de HTP final generados usando el modelo ajustado de la ecuación 1. La tabla incluye:

- (1) los valores observados de concentración de HTP final.
- (2) el valor predicho de la concentración de HTP final usando el modelo ajustado.
- (3) el residuo (valor observado – valor predicho).
- (4) intervalos de confianza del 95,0 % para la respuesta media.

Tabla 4: Resultados Estimados para la concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

	<i>Observados</i>	<i>Ajustados</i>		<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
<i>Fila</i>	<i>Valores</i>	<i>Valores</i>	<i>Residuos</i>	<i>para Media</i>	<i>para Media</i>
1	10499,5	9560,0	939,5	6630,13	12489,9
2	11639,0	11318,4	320,625	8388,51	14248,2
3	16232,5	16485,4	-252,938	12897,1	20073,8
4	10372,5	8372,5	2000	5980,27	10764,7
5	9645,5	9895,69	-250,188	6307,35	13484,0
6	5273,5	8372,5	-3099	5980,27	10764,7
7	7432,0	7249,5	182,5	4319,63	10179,4
8	8327,5	8077,31	250,188	4488,97	11665,7
9	8351,0	9639,31	-1288,31	6709,45	12569,2
10	15040,0	14787,1	252,938	11198,7	18375,4
11	9727,5	9699,31	28,1875	6769,45	12629,2
12	5599,5	5630,44	-30,9375	2700,57	8560,3
13	6861,5	5570,44	1291,06	2640,57	8500,3
14	9471,5	8372,5	1099	5980,27	10764,7
15	4048,5	5491,13	-1442,63	2561,26	8420,99

En la figura 5 se observa el grafico de cubo en la cual se muestran los valores de la respuesta predicha, cuando los factores toman niveles extremos (bajo o alto).

Gráfica de Cubo para Concentración de HTP final

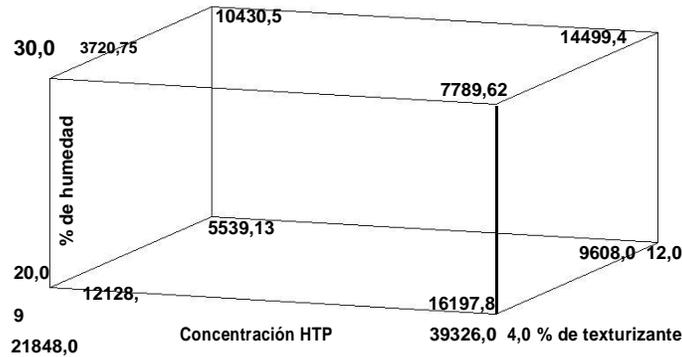


Figura 5: Gráfica de Cubo para la concentración de HTP final. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Tecnologías, 2010).

Las menores concentraciones de HTP finales se hallan en los vértices que corresponden a el factor % de humedad (C) en su nivel alto y al factor % de texturizante (B) en su nivel bajo o viceversa corroborado que la interacción BC es el coeficiente del modelo que más influye en la variabilidad de la respuesta. Asimismo, se obtiene la menor concentración de HTP final entre los vértices, en el vértice formado por el nivel de los factores concentración inicial de HTP en bajo (21 848 mg/kg), % de texturizante bajo (4 %) y % de humedad alto (30 %).

En la figura 6 se observa el gráfico de mallas que representa el gráfico de superficie de respuesta, estimada del modelo, en 3D obtenido.

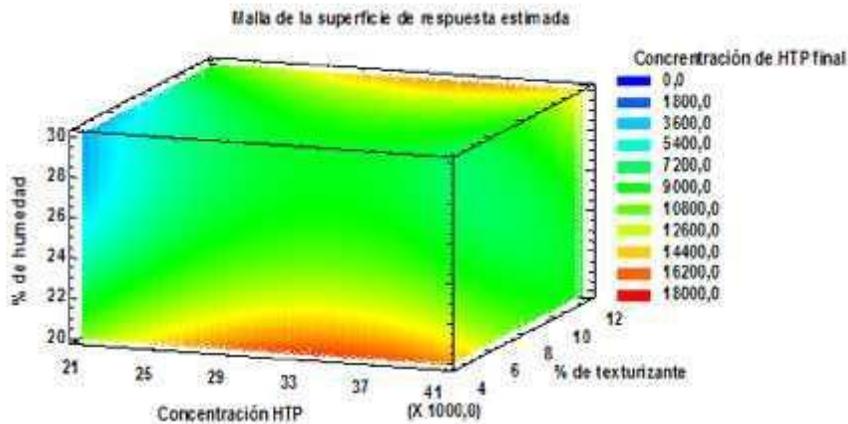


Figura 6: Malla de superficie de respuesta estimada para la concentración de HTP final . Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Tecnologías, 2010).

En el gráfico de malla de superficie de respuesta de la figura 6, se observa como el color verde – azul, que representa la región con menores concentraciones de HTP final (hasta 5 400 mg/kg) se encuentra en la región de menor concentración inicial de HTP, mayor % de humedad y menor % de texturizante.

Supuestos del diseño:

Normalidad:

La gráfica de Probabilidad Normal (a) y el Histograma (b) para los Residuos de la figura 7 ayudaron a determinar si los residuos siguen la distribución normal supuesta, o no. Se ha escalado de tal modo que, si los residuos siguen una distribución normal, los puntos caerán aproximadamente a lo largo de una línea recta. Cualquier desviación consistente de la línea recta sería un signo de comportamiento no normal, el cual a menudo puede corregirse transformando los valores de Masa de HTP removida.

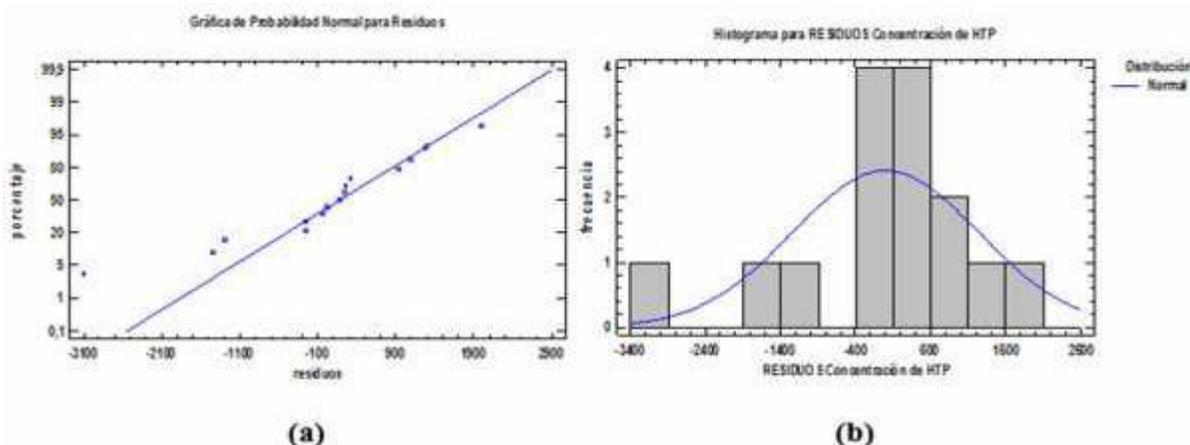


Figura 7: (a) Gráfica de Probabilidad Normal para Residuos y (b) Histograma de residuos. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Se observaron los residuos del modelo bastante ajustado a la línea recta. En Histograma de Residuos se encuentra ajustado a la línea de Distribución Normal (campana de Gauss).

Además, se corroboró la distribución de normalidad de los datos por los resultados del método analítico que se observa en la tabla 5.

Tabla 5: Pruebas de Normalidad para los residuos. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,9245	0,223805

En la tabla 5 se observa la prueba de Shapiro-Wilk. Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor que 0,05, no se puede rechazar la idea de que RESIDUOS proviene de una distribución normal con 95 % de confianza.

Igualdad de varianza:

En la figura 8 se muestra la gráfica de residuo vs predicho del diseño. Esta gráfica despliega los residuos versus los valores predichos de Masa de HTP removida. Cualquier patrón no aleatorio podría indicar que el modelo seleccionado no describe adecuadamente los datos observados. Esta gráfica es especialmente buena para mostrar heteroscedasticidad, en la cual, la variabilidad de los residuos cambia conforme cambian los valores de la variable dependiente.

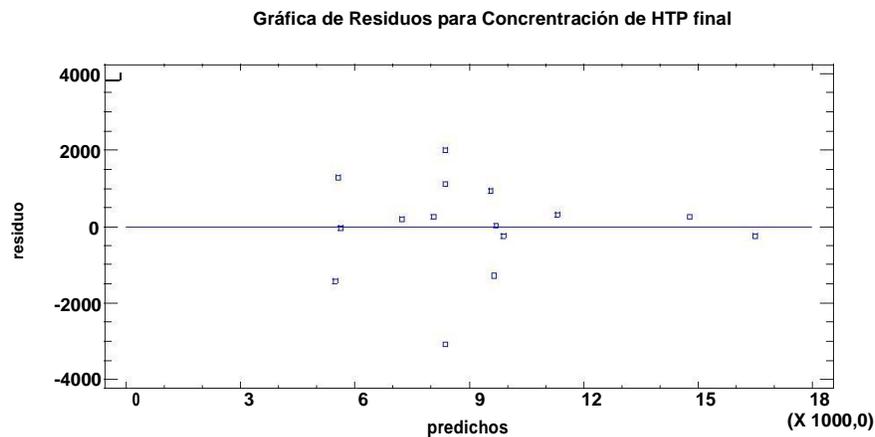


Figura 8: Gráfica de Residuos vs. Predicho. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede apreciar los puntos se distribuyen a lo largo de toda la línea horizontal sin ningún patrón contundente. Por tal razón podemos afirmar que los residuos del modelo del diseño cumplen con el supuesto de igualdad de varianza (heteroscedasticidad).

Independencia:

En la figura 9 se observa la gráfica de residuos vs número de ejecución. Cualquier patrón no aleatorio podría indicar correlación serial en los datos, si el orden en las filas corresponde al orden en que los datos fueron recolectados.

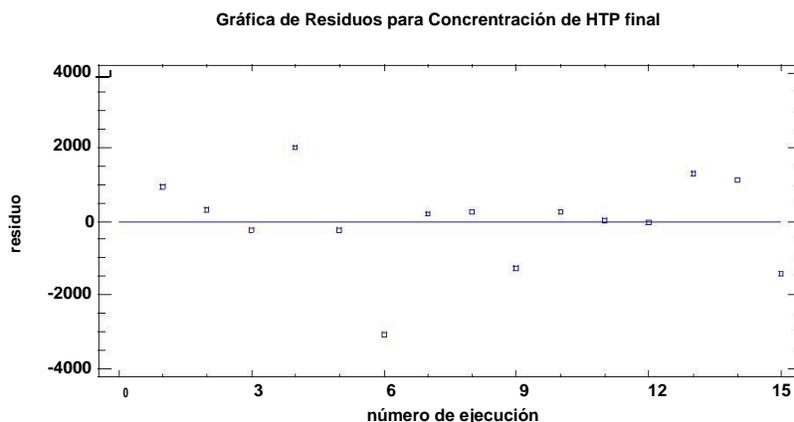


Figura 9: Gráfica de Residuos vs Número de ejecución. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurion versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Como se puede apreciar no existe ningún patrón diferente a una dispersión aleatoria, por tanto, se cumple el supuesto de independencia. Esta observación se corroboró con la prueba analítica de Durbin – Watson, en la cual su valor-P mostrado en los estadísticos del modelo es de 0,3942, es mayor que 5,0 %, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 95 %. Por lo que queda corroborado que se cumple el supuesto de normalidad.

Anexo 47: Función de deseabilidad evaluada en cada punto del diseño. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

			<i>Deseabilidad</i>	<i>Deseabilidad</i>
<i>Fila</i>	<i>Masa de HTP removida</i>	<i>Concentración de HTP final</i>	<i>Prevista</i>	<i>Observada</i>
1	1,1	10499,5	0,865677	0,779716
2	1,05	11639,0	0,698539	0,665458
3	0,55	16232,5	0,0	0,0
4	0,77	10372,5	0,666739	0,498568
5	0,8	9645,5	0,540096	0,563479
6	0,96	5273,5	0,666739	0,449168
7	0,55	7432,0	0,0982024	0,0
8	0,85	8327,5	0,699577	0,6762
9	1,18	8351,0	0,857743	0,97845
10	0,59	15040,0	0,119512	0,095901
11	1,12	9727,5	0,850135	0,845522
12	0,62	5599,5	0,205181	0,208835
13	0,57	6861,5	0,208708	0,150331
14	0,8	9471,5	0,666739	0,570873
15	0,68	4048,5	0,208476	0,0

Anexo 48: Salida de la función deseabilidad. Fuente: Elaboración propia, salida del software Statgraphics Centurión versión XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies, 2010).

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 1,0

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración HTP	21848,0	39326,0	39278,0
% de texturizante	4,0	12,0	6,44611
% de humedad	20,0	30,0	25,9464

Respuesta	Óptimo
Masa de HTP removida	1,18776
Concentración de HTP final	8000,0

Anexo 49: Cálculo de la concentración de HTP final en función de los valores de las variables seleccionadas. Fuente: Elaboración propia, utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, 2016).

2								
3	Modelo ajustado que describe el comportamiento de la concentración de HTP final en función de los factores estudiados							
4								
5	Concentración de HTP final = 75587,0 + 2,09287*A - 5733,09*B - 6214,54*C - 0,0000304062*A ² - 1,30967E-10*A*C + 99,0312* B ² + 166,244*B*C + 94,175*C ²							
6								
7	Coeficientes del modelo		Valores seleccionados			Concentración de HTP final		
8	Constante	Estimados	A	B	C	(mg/kg)		
9	A: Concentración HTP (mg/kg)	75587	39278	8	25	8099,19		
10	B: % de texturizante	2,09287						
11	C: % de humedad	-5733,09						
12	AA	-6214,54					Norma de disposición final según ONN (2017)	
13	BB	-3,04062E-05					10000,00	
14	BC	99,0312						
15	CC	166,244						
16		94,175						

Anexo 50: Número de organismos vivos que se depositaron inicialmente en la cada muestra y a los sobrevivientes a los 21 días de estar expuesto en los ensayos. Fuente: (Valle, 2020b).

Fecha	7/02/2020	28/02/2020
T1	5	0
T2	5	0
T3	5	0
T4	5	0
T5	5	0
T6	5	0
T7	5	0
T8	5	0
T9	5	0
T10	5	0
T11	5	0
T12	5	0
T13	5	0
T14	5	0
T15	5	0
C1	5	5
C1	5	5

Anexo 51: Cálculo del Índice de Germinación (IG), porcentaje relativo de germinación (PRG) y crecimiento relativo de las raíces (CRR). Fuente: (Valle, 2020a).

Código	Semillas germinadas	% Semillas Germinadas	Promedio de la elongación de la radícula (cm)	PGR (%)	CRR (cm)	IG (%)	Escala de evaluación:
T1	5	50	0,40	50	14,285714	7,14	Severa
T2	0	0	0,00	0	0	0,00	Severa
T3	0	0	0,40	0	26,315789	0,00	Severa
T4	0	0	1,20	0	78,947368	0,00	Severa
T5	0	0	0,60	0	39,473684	0,00	Severa
T6	0	0	0,60	0	39,473684	0,00	Severa
T7	0	0	0,30	0	19,736842	0,00	Severa
T8	0	0	0,71	0	46,710526	0,00	Severa
T9	0	0	0,65	0	42,763158	0,00	Severa
T10	0	0	0,35	0	23,026316	0,00	Severa
T11	0	0	0,50	0	32,894737	0,00	Severa
T12	0	0	0,60	0	39,473684	0,00	Severa
T13	0	0	0,60	0	39,473684	0,00	Severa
T14	0	0	0,72	0	47,368421	0,00	Severa
T15	0	0	2,80	0	184,21053	0,00	Severa
C1	10	10	1,52	100	100	100,00	Leve
C2	9	9	0,86	90	56,578947	50,92	Leve
		Severa = IG ≤ 50 % Moderada= IG entre 50 y 80 % Leve= IG ≥ 80 %					